



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EXPRESIÓN GENÉTICA DE *SIRT1*, *CAPN10* Y *VEGFA* EN
UNA POBLACIÓN INFANTIL DE LA CIUDAD DE MÉXICO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VÍCTOR JESÚS MORALES ARROYO

DIRECTOR: DR. FERNANDO SUÁREZ SÁNCHEZ
ASESORA: DRA. CATALINA SORIANO CORREA



MÉXICO, D.F.

ABRIL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno MORALES ARROYO VÍCTOR JESÚS con número de cuenta 40906674-8 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 25 del mes de Abril de 2016 a las 13:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

Table with 3 columns: Position (PRESIDENTE, VOCAL*, SECRETARIO, SUPLENTE, SUPLENTE), Name (MTRA. LEONOR AGUILAR SANTELISES, DR. FERNANDO SUÁREZ SÁNCHEZ, DRA. CATALINA SORIANO CORREA, DRA. MA. ISABEL SOTO CRUZ, Q.F.B. IXEL VENECIA GONZÁLEZ HERRERA), and Signature.

El título de la tesis que se presenta es: Expresión genética de SIRT1, CAPN10 y VEGFA en una población infantil de la ciudad de México.

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" Ciudad de México, a 04 de Abril de 2016. DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ DIRECTOR DIRECCION

RECIBI OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo.Bo. DRA. RAQUEL RETANA UGALDE JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

DEDICATORIA

A mis padres. Que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias a los dos por darme una carrera para mi futuro y creer en mí, brindándome todo su amor y apoyo. Gracias a ustedes soy lo que soy, formándome con buenos sentimientos, hábitos y valores día con día. Ustedes serán siempre mis modelos a seguir.

A Mirian. Tu compañía y ayuda fue fundamental para terminar mi proyecto, y a pesar de que tu no lo veías, eras quien me motivaba a enfrentar mi mayor obstáculo en la vida: el miedo. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para ti, gracias por estar a mi lado y nunca soltarme de la mano.

A mi director el Dr Fernando Suarez. Les agradezco por el apoyo, orientación y experiencia que me brindó día con día para culminar mi meta, porque en los momentos que pensaba rendirme, usted insistió en que siguiera adelante.

A mi asesora, la Dra Catalina Soriano. Usted me enseñó que si quiero ser alguien importante en la vida tengo que triunfar como profesional, en la vida hay momentos fáciles y difíciles y gracias a usted he logrado afrontar esos momentos difíciles con la frente en alto.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto “Genética de la Obesidad Infantil y Adolescente” con calve de registro FIS/IMSS/PRI0/10/011 del cual deriva este trabajo.

A la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, por prestar sus instalaciones para realizar este trabajo.

Al Área de Química Computacional de la FES Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el tiempo de cómputo otorgado.

A la carrera de Química Farmacéutico Biológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la preparación académica brindada.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
3. ÍNDICE DE TABLAS	9
4. ABREVIATURAS	10
5. INTRODUCCIÓN.....	11
6. MARCO TEÓRICO	14
6.1. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP).....	14
6.2. EXPRESIÓN GÉNICA.....	15
6.3. OBESIDAD.....	18
6.4. DIABETES.....	20
6.5. ALTERACIONES DE ALGUNOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DURANTE LA OBESIDAD Y DT2	23
6.6. GENES DE ESTUDIO	25
6.6.1. GEN <i>SIRT1</i>	25
6.6.2. GEN <i>CAPN10</i>	28
6.6.3. GEN <i>VEGFA</i>	31
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
8. OBJETIVO GENERAL	36
8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
9. HIPÓTESIS DE TRABAJO	37
10. MATERIAL Y MÉTODOS	38
10.1. DISEÑO DE ESTUDIO	38
10.2. DIAGRAMA DE FLUJO	39
10.3. TOMA DE MUESTRA Y DATOS GENERALES.....	40
10.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	40
10.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	41
10.4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	41
10.5. ANÁLISIS IN SÍLICO.....	42
10.6. EXTRACCIÓN DEL DNA.....	42
10.7. EXTRACCIÓN DEL RNA.....	43
10.7.1. TRATAMIENTO CON DNasa DEL RNA.....	43
10.7.2. OBTENCIÓN DE cDNA	44
10.8. GENOTIPIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	44

10.9.	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	46
10.9.1.	DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS	46
10.9.2.	ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR	47
10.9.3.	REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL	47
10.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
11.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
11.1.	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	49
11.2.	EXTRACCIÓN DE DNA Y RNA	50
11.3.	<i>SIRT1</i>	51
11.4.	<i>CAPN10</i>	55
11.5.	<i>VEGFA</i>	59
12.	CONCLUSIONES	63
13.	PERSPECTIVAS	64
14.	GLOSARIO	65
15.	ANEXOS	67
16.	REFERENCIAS	73

1. RESUMEN

Diversos estudios en distintas poblaciones indican que existe un aumento en el número de adultos jóvenes que desarrollan enfermedades metabólicas y que se relaciona estrechamente con cambios en el ambiente, estilo de vida y a factores genéticos. A través del análisis del Estudio de Asociación del Genoma Completo (GWAS, por sus siglas en inglés), se han identificado SNPs asociados a enfermedades metabólicas y comorbilidades.

En particular, en este trabajo nos enfocamos al estudio de SNPs presentes en tres genes asociados a DT2 y obesidad en una población infantil de la Ciudad de México. Estos son *SIRT1* (rs3758391), gen que promueve la gluconeogénesis y la oxidación de los ácidos grasos en el hígado; *CAPN10* (rs3792267), un tipo de calpaína que regula la captación de glucosa en las células del músculo esquelético e induce la liberación de insulina en las células β del páncreas; y *VEGFA* (rs25648), gen que regula la vasculogénesis y angiogénesis en el tejido adiposo.

La expresión génica se determinó mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR Green y cebadores específicos para estos genes. También se evaluó la asociación entre estos SNPs con los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL.

Los resultados nos permitieron concluir que los portadores del alelo de riesgo T del rs3758391 muestran una mayor expresión del gen *SIRT1*. Se observó una menor expresión de *CAPN10* en niños que presentan sobrepeso u obesidad, pero esta no se correlaciona con el genotipo del rs3792267. Por otro lado, el polimorfismo rs25648 no altera la expresión del gen *VEGFA* en sangre periférica de niños. No se encontró asociación entre la expresión de *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA* con ninguno de los parámetros bioquímicos medidos.

2. ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Proceso de replicación, transcripción y traducción de un gen.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2. Elementos de la transcripción del mRNA</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3. Comparación de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Factores que favorecen el desarrollo de la DT2</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5. Proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6. El SNP rs3758391 en el gen SIRT1.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 7. La isoforma 54kDa de CAPN10 proteoliza SNAP-25.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 8. El polimorfismo SNP-43 (rs3792267) en el gen CAPN10.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 9. El SNP rs25648 en el gen VEGFA.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 10. Electroforesis de muestras de DNA de niños</i>	<i>51</i>
<i>Figura 11. Electroforesis de muestras de RNA de niños.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 12. Genotipificación del rs3758391.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 13. Expresión de SIRT1 de los genotipos TT y CC.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 14. Expresión de SIRT1 de niños con obesidad y peso normal.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 15. Genotipificación del SNP rs3792267.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 16. Expresión de CAPN10 de los genotipo GG y AG.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 17. Expresión de CAPN10 de niños con obesidad y peso normal</i>	<i>58</i>
<i>Figura 18. Genotipificación del SNP rs25648.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 19. Expresión de VEGFA de los genotipos CC y CT</i>	<i>61</i>
<i>Figura 20. Expresión del VEGFA en niños con peso normal y obesidad</i>	<i>62</i>
<i>Figura 21. Percentiles de IMC por edad para varones</i>	<i>67</i>
<i>Figura 22. Percentiles de IMC por edad para mujeres</i>	<i>68</i>
<i>Figura 23. Representación del umbral y Ct en una amplificación por PCR</i>	<i>70</i>
<i>Figura 24. Eficiencia de una reacción de PCR</i>	<i>71</i>

3. ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación del peso en base al percentil del IMC.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 2. Condiciones de temperatura para la síntesis de cDNA</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 3. Sondas TaqMan de los polimorfismos SIRT1, CAPN10 y VEGFA.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 4. Condiciones de PCR</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la expresión génica.</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 6. Concentraciones de oligonucleótidos de los genes SIRT1, CAPN10 y VEGFA.</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 7. Parámetros bioquímicos y antropométricos en niños.</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 8. Parámetros bioquímicos agrupados por genotipo para el rs3758391.</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 9. Parámetros bioquímicos agrupados por genotipo para el rs3792267.</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 10. Parámetros bioquímicos agrupados por genotipo para el rs25648.</i>	<i>62</i>

4. ABREVIATURAS

CAPN10	Calpaína 10
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ct	Ciclo que sobrepasa el umbral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT2	Diabetes tipo 2
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GOIA	Proyecto de genética de la obesidad infantil y adolescente
GWAS	Estudios de asociación en todo el genoma
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IMC	Índice de masa corporal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGK1	Fosfoglicerato cinasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SIRT1	Sirtuina 1
SNP(s)	Polimorfismo(s) de un solo nucleótido
UTR	Regiones no traducidas de los genes
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular

5. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la obesidad ha crecido en las últimas décadas y se ha convertido en un problema de salud pública para todos los grupos de edad en el mundo. La obesidad se caracteriza por un incremento del peso corporal, a expensas del aumento del tejido adiposo (1). El sobrepeso y la obesidad aumentan el riesgo de desarrollar otras enfermedades como hipertensión, dislipidemia, problemas respiratorios, diabetes tipo 2 (DT2) entre otras (2). La relación entre obesidad y DT2 tiene mucho tiempo de haber sido reconocida y aunque no todos los sujetos obesos desarrollen DT2, la mayoría de los pacientes con DT2 presentan obesidad. Tanto la DT2 como la obesidad son enfermedades multifactoriales en donde los factores ambientales, como el estilo de vida y la alimentación; así como factores genéticos, tales como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y variaciones en el número de copias (CNV's), tienen una contribución importante en la aparición y desarrollo de estas enfermedades (1).

En la obesidad, los niveles de ácidos grasos libres aumentan debido a un incremento en la lipólisis en el tejido adiposo. Esto conlleva al desarrollo de resistencia a la insulina en el músculo esquelético (3–6). La diabetes se presenta cuando se desarrolla resistencia a la insulina aunada a la disfunción de las células β pancreáticas, dando como resultado hiperglucemia (7).

A partir de los GWAS (Estudios de Asociación del Genoma Completo) (8), se ha logrado identificar un gran número de SNPs asociados a diferentes enfermedades (9). Aunque estos estudios por si solos no permiten conocer las alteraciones que los SNP provocan en las células, se sabe que estos pueden ir desde alteraciones en el splicing del mRNA, modificar los codones y producir proteínas con

aminoácidos que modifiquen su estructura y función biológica (10). También se han reportado alteraciones en la región 5'UTR del mRNA, que pueden provocar una disminución en la traducción del mRNA y por tanto reducir la producción de las proteínas desde un 30% hasta un 80% (11). En la región promotora del gen, se encuentran componentes esenciales que dan inicio a la transcripción, facilitan el acoplamiento de la polimerasa y distintos factores de transcripción; por lo que la presencia de SNP's en esta área pueden activar o reprimir la transcripción (12).

Las características que definen a una célula están dadas por las proteínas que la constituyen, las cuales son el resultado de patrones específicos de la expresión de sus genes controlados por elementos reguladores como los promotores, potenciadores y silenciadores (13). Estudiar la asociación entre los SNP's con la expresión génica es una importante estrategia para describir los mecanismos reguladores que están presentes en el desarrollo de las enfermedades como la obesidad y la DT2 (14,15).

En particular, en este trabajo nos enfocamos al estudio de SNPs presentes en tres genes asociados a DT2 y obesidad. Estos son *SIRT1* (rs3758391), *CAPN10* (rs3792267) y *VEGFA* (rs25648).

Se sabe que el gen regulador de información silencioso (*SIRT1*) puede remover los grupos acetil de una gran variedad de histonas, y regula la activación de un amplio número de genes que participan en la regulación del metabolismo y el envejecimiento, la gluconeogénesis hepática, la secreción de insulina, la liberación de ácidos grasos durante el ayuno y el anabolismo de los lípidos en el tejido adiposo (16).

Otro gen asociado con el desarrollo de la diabetes es *CAPN10* (un miembro de la familia de las calpaínas). Las calpaínas son cisteínas proteasas citoplasmáticas que requieren iones calcio para su actividad y su función es regulada por iones calcio (17). *CAPN10* se ha asociado con obesidad, síndrome metabólico, la secreción de insulina, el metabolismo y transporte de la glucosa a los tejidos además de la DT2 (18–21). Distintas variantes genéticas en el gen *CAPN10* han sido asociadas con la susceptibilidad a DT2, como son el SNP-44 (rs2975760), SNP-43 (rs3792267) y el SNP-19 (rs3842570) (17).

El gen *VEGFA* también ha sido relacionado con la obesidad y complicaciones de la diabetes. Este gen codifica una proteína de señalización que participa en la vasculogénesis y en la angiogénesis (22). En la obesidad severa, el tejido adiposo está sujeto a estrés oxidativo e hipoxia local lo que promueve la secreción de factores angiogénicos como *VEGFA* (23,24). En la actualidad se ha reportado una gran asociación entre polimorfismos localizados en la región 5'-UTR de *VEGFA* y la retinopatía diabética (25–29).

6. MARCO TEÓRICO

6.1. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP)

Los SNPs se definen como el cambio de una sola base en una secuencia específica del DNA y cuya frecuencia en la población es mayor al 1% (30). El ácido desoxirribonucleico (DNA) es una molécula localizada en el núcleo de las células y contiene la información genética necesaria para el desarrollo y funciones de los organismos (31–33). En el ser humano, el DNA contiene aproximadamente 3×10^9 pares de bases; sin embargo, la secuencia del DNA entre los individuos presenta variaciones. En particular, se considera que el 90% de la diversidad fenotípica humana proviene de variaciones en el DNA.

En el genoma humano, se estima que la tasa promedio de variantes en el DNA es de 1 por cada 1200 bases. En su gran mayoría, estas variantes se encuentran distribuidas en los intrones, en segundo lugar en el DNA intergénico; finalmente y en menor cantidad, en las regiones codificantes (exones) del DNA (30,34).

Las alteraciones celulares que se producen a consecuencia de los SNP's en el DNA son diversas. La presencia de SNP's en la región codificante de los genes, pueden modificar los codones y generar proteínas con aminoácidos distintos que modifican su estructura y función biológica (10). Se ha reportado que los cambios de secuencia en la región 5'UTR del mRNA pueden provocar una disminución en la traducción del mismo y por tanto reducir la producción de las proteínas desde un 30% hasta un 80% (11). En la región promotora de los genes se encuentran componentes esenciales que dan inicio al proceso de transcripción, al acoplamiento

de la polimerasa y distintos factores de transcripción, por lo que la presencia de SNP's en esta área pueden activar o reprimir este proceso (12).

Los GWAS han establecido la asociación entre distintos genotipos derivados de los SNP's y el fenotipo observado en distintas enfermedades, como la DT2 (14). Sin embargo, a pesar de que los GWAS son una herramienta muy útil en la búsqueda de SNPs, aún no existe una descripción detallada de las alteraciones que genera cada uno de los SNPs asociados, y de cómo propician el desarrollo de estas enfermedades (35). Es de interés particular en este trabajo el efecto de la presencia de los SNP's sobre la expresión génica, como una importante estrategia para descifrar los mecanismos reguladores que conducen a estas asociaciones (14,15).

6.2. EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica es el proceso por el cual las instrucciones genéticas en el DNA son utilizadas para sintetizar distintos productos en la célula. Estos productos son generalmente las proteínas, que tienen funciones esenciales, como las enzimas y hormonas. Sin embargo, no todos los genes codifican para proteínas, también pueden sintetizar algunos tipos de RNA no codificante, como por ejemplo, RNA de transferencia, RNA ribosomal, microRNAs, RNA pequeños (siRNA) (36).

Las características que definen a una célula están dadas por las proteínas que la constituyen, las cuales son el resultado de patrones específicos de expresión de sus genes (37). En los organismos eucariontes, los genes están formados por regiones intrónicas y exónicas. Los exones son las regiones de DNA que codifican a las

proteínas, mientras que los intrones son regiones no codificantes que separan a los exones (37).

En los organismos eucariontes la transcripción del RNA mensajero (mRNA) es un proceso que consiste de tres etapas (Figura 1):

1. La transcripción inicia en el núcleo de la célula, cuando se genera una cadena simple de RNA que es complementaria a la secuencia de la cadena antisentido del DNA (mRNA inmaduro).
2. El mRNA inmaduro es procesado en el núcleo por la maquinaria celular. Este proceso se lleva a cabo en tres pasos: i) al mRNA se le adiciona un guanilato en el extremo 5' del primer nucleótido (CAP); ii) se añaden entre 200 y 250 adeninas en el extremo 3' (cola de poli-A); iii) se eliminan los intrones mediante el corte de intrones y empalme de exones (*splicing*). El RNA maduro se transloca del núcleo al citoplasma de la célula.
3. En el citoplasma, el mRNA maduro se traduce con la ayuda de los ribosomas y se genera una cadena de aminoácidos que forman el polipéptido (31).

La compleja coordinación de la expresión génica en los organismos eucariotas ha requerido el desarrollo de múltiples niveles de regulación (38). Entre los elementos reguladores de la expresión génica que se han descrito encontramos los promotores, potenciadores y silenciadores; cuya función principal es el encendido y apagado de genes en el DNA (Figura 2) (13). Los promotores son secuencias continuas de DNA cercanas al sitio del inicio de la transcripción donde se ensamblan los factores de transcripción, la RNA polimerasa y otras proteínas reguladoras para que dé inicio el proceso de transcripción. Alteraciones en esta región pueden afectar

la unión de la polimerasa, de proteínas activadoras o represoras y modifica la cantidad de mRNA que se transcribe (35).

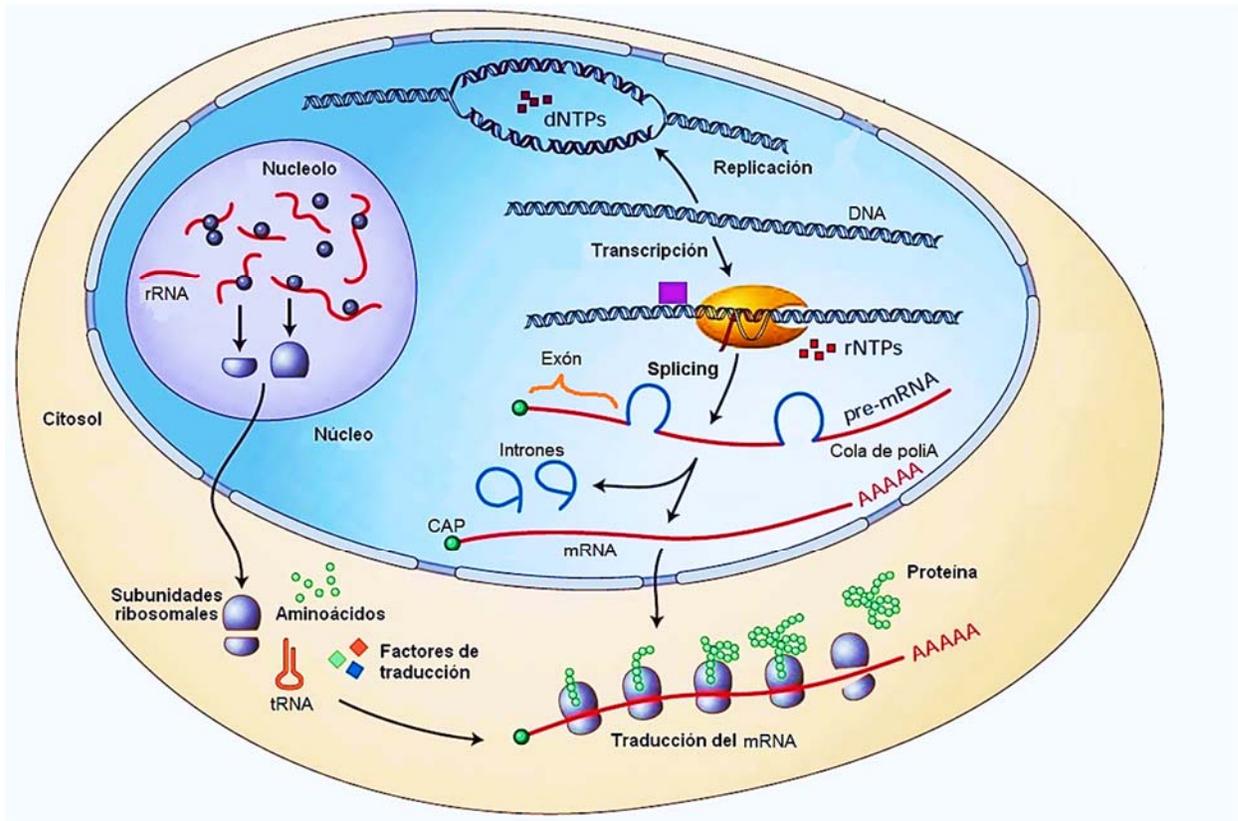


Figura 1. Proceso de replicación, transcripción y traducción de un gen (37).

Mientras tanto, los potenciadores son elementos que pueden localizarse en regiones alejadas del sitio de inicio de la transcripción. Estos reclutan proteínas (factores de transcripción) para aumentar los niveles de transcripción de los genes (39). Mutaciones en estas regiones pueden activar o inhibir su actividad reguladora (35). Finalmente, los silenciadores son elementos que poseen una organización modular al igual que los enhancers, pero estos tienen un efecto negativo sobre la transcripción (40).

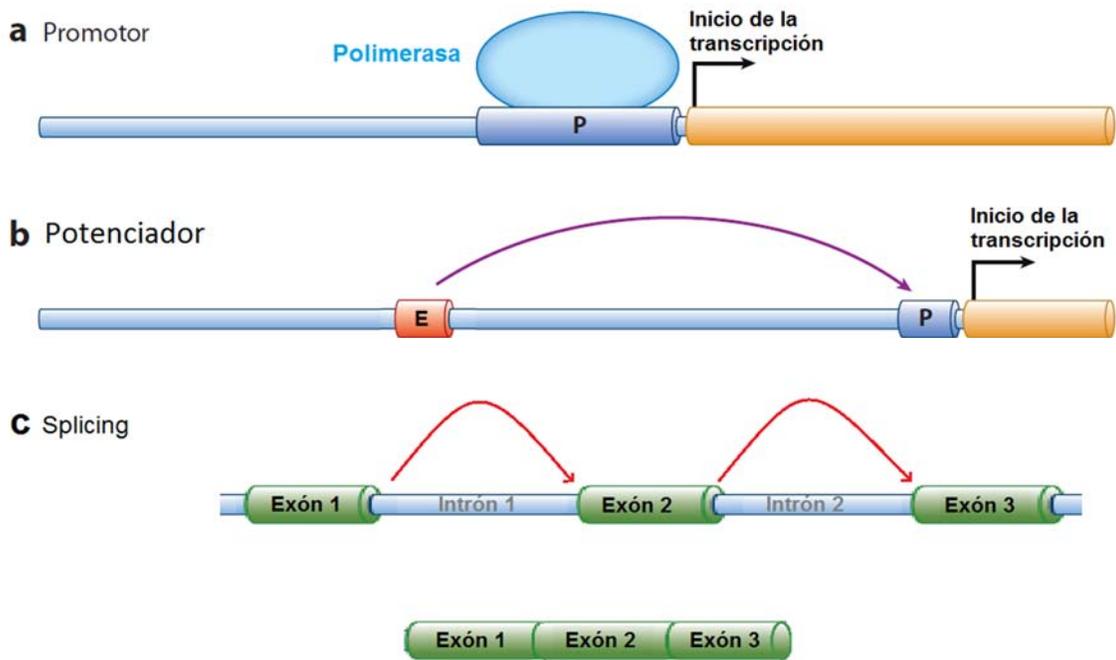


Figura 2. Elementos y mecanismo que están involucrados en la transcripción y maduración del mRNA (39).

6.3. OBESIDAD

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa, resultado de un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético (1,41). Cada año fallecen por lo menos 2,8 millones de personas adultas, como consecuencia de comorbilidades asociadas al sobrepeso y a la obesidad (41). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 40 millones de niños menores de cinco años de edad presentaban sobrepeso en 2010. De estos se calcula que los países en vías de desarrollo tienen una población de cerca de 35 millones de niños con sobrepeso, mientras que en los países desarrollados ésta cifra es de 8 millones (41). Si bien, hace varios años el sobrepeso y la obesidad eran considerados un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente

ambos trastornos han aumentado dramáticamente en los países de ingresos bajos y medianos, particularmente en los entornos urbanos.

En México, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012) (42), la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población en edad escolar, (de 5 a 11 años de edad) fue de 34.4% (19.8% para sobrepeso y 14.6% para obesidad). Esta cifra representa un incremento del 7.5% (1.9% para sobrepeso y 5.6% para obesidad) respecto a las cifras reportadas en 1999 (Figura 3).

La clasificación más empleada en niños y niñas en edades de 2 a 20 años, se basa en las Tablas de los estándares de crecimiento del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC-2000 (43). Estas Tablas dividen a la población en percentiles con base a su edad, índice de masa corporal (IMC) y sexo, clasificando el peso en cuatro categorías que se describen en la Tabla 1 (43).

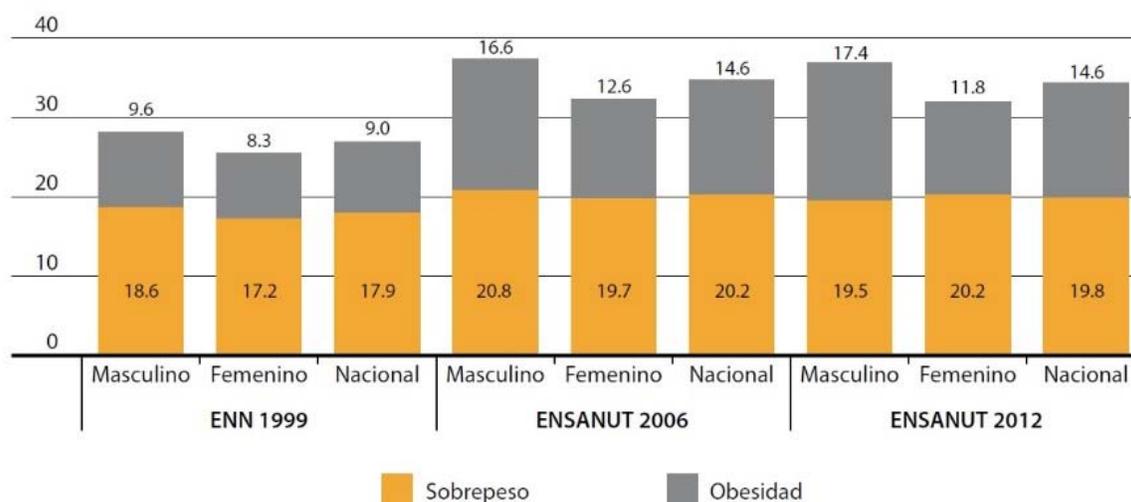


Figura 3. Comparación de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en la población de 5 a 11 años de edad, de la ENN 99, ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012, por sexo, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS (42).

Tabla 1. Clasificación del peso en base al percentil del IMC según las Tablas de crecimiento de la CDC (43).

Percentil	Clasificación
Menor de 5	Bajo peso
De 5 a menos de 85	Peso saludable
De 85 a menos de 95	Sobrepeso
Igual o superior a 95	Obeso

La obesidad se caracteriza por un incremento del tejido adiposo. En la mayoría de los casos la obesidad se acompaña de resistencia a la insulina y alteraciones como dislipidemia, hipertensión y problemas cardiacos como infarto al miocardio. Otras consecuencias de la obesidad son el desarrollo de hígado graso, desarrollo de fibrosis hepática, litiasis biliar e insulinoresistencia. Con el tiempo, la resistencia a la insulina y disfunción de las células β pancreáticas alteran la homeostasis de la glucosa, desencadenando el desarrollo de DT2 (2,44). Con base a esto, la población infantil que presenta obesidad tiene un mayor riesgo de desarrollar DT2 durante la edad adulta.

6.4. DIABETES

La DT2 puede describirse como una serie de alteraciones celulares y metabólicas que afectan y deterioran la homeostasis de la glucosa, a través de dos mecanismos patogénicos: 1) un deterioro progresivo de la función de las células β pancreáticas, que provoca la disminución de la síntesis de insulina, y 2) una resistencia de los tejidos periféricos a la insulina, que da como resultado un descenso de la respuesta metabólica a la insulina (45). Con el paso del tiempo, la glucotoxicidad, la

lipotoxicidad y el estrés oxidativo característicos en los individuos con DT2 provocan la disfunción de las células β del páncreas e inducen la resistencia a la insulina (46,47). Actualmente, los factores ambientales como el estilo de vida y la alimentación han sufrido cambios importantes respecto a décadas pasadas. Estos cambios, aunados a la predisposición genética de nuestra población han propiciado un aumento importante en el número de casos de DT2 (Figura 4) (48).

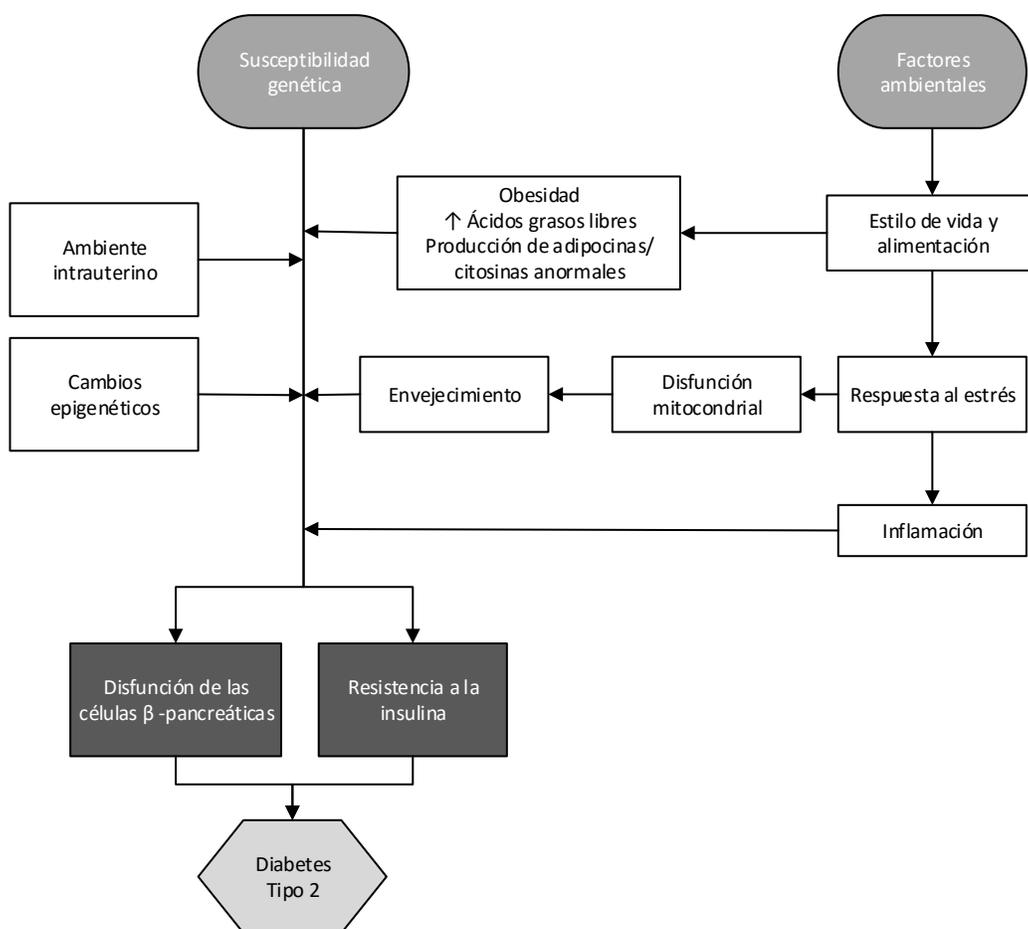


Figura 4. Factores que favorecen el desarrollo de la DT2 (48).

Cifras obtenidas en México por ENSANUT 2012, señalan que la proporción de adultos con diagnóstico médico de diabetes es de 9.2%, lo que indica un incremento

importante en comparación a lo reportado en la ENSA 2000 (5.8%) y en la ENSANUT 2006 (7%), como se muestra en la Figura 5 (42). Esta cifra de pacientes con DT2 representa para el país un gasto de 3,430 millones de dólares al año en su atención médica y complicaciones. (42).

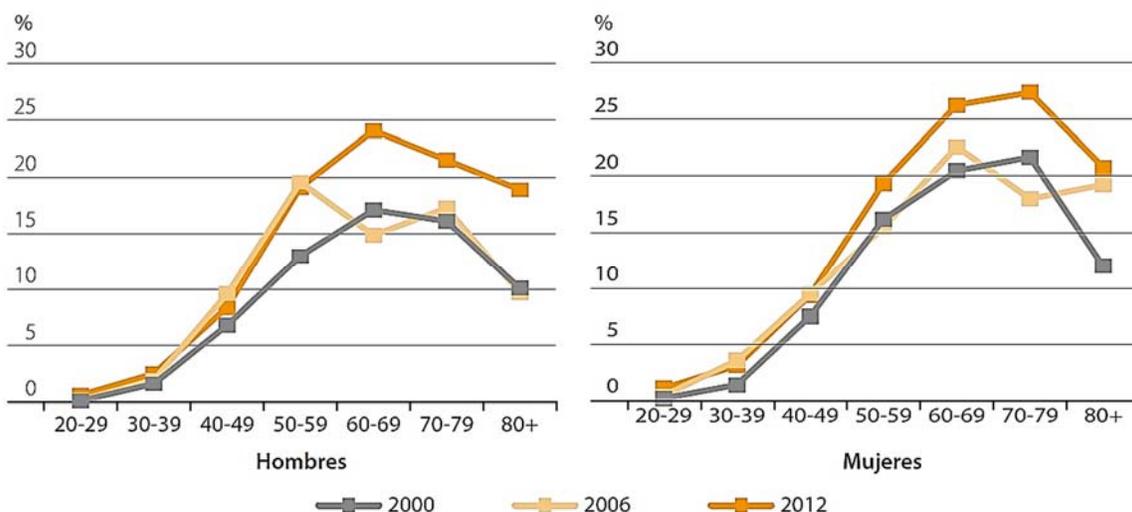


Figura 5. Proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes por sexo y edad. México, ENSA 2000, ENSANUT 2006 y 2012 (42).

En los pacientes con DT2, los desórdenes en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas juegan un papel predominante en el desarrollo de las complicaciones de dicha enfermedad (49). Se ha asociado la DT2 con el desarrollo de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperglicemia, esta última puede alterar las lipoproteínas presentes en el torrente sanguíneo y desarrollar aterogénesis (50). Se ha reportado que los niveles de HDL disminuyen en este tipo de pacientes (51).

Entre las complicaciones agudas se encuentran la descompensación hiperglucémica cetoacidótica (DHC), que es el aumento de la producción de ácidos

grasos libres y cuerpos cetónicos provocada por la deficiencia de insulina; y la descompensación hiperglucémica hiperosmolar (DHH), que es el aumento intenso de glucosa en sangre asociada a deshidratación y aumento de hiperosmolaridad (49). Las complicaciones crónicas se dividen a su vez en microvasculares y macrovasculares. Entre las complicaciones macrovasculares se encuentran la cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, la enfermedad vascular cerebral y la insuficiencia arterial periférica; que son la principal causa de muerte en el paciente con diabetes. (52). En las complicaciones microvasculares está la nefropatía diabética, que es el aumento de la excreción urinaria de albúmina y alteraciones en la filtración glomerular (53); la neuropatía diabética que se define como un grupo heterogéneo de alteraciones del sistema nervioso periférico que puede expresarse en cualquier localización corporal con alteraciones sensitivas, motoras, autonómicas o mixtas (54,55).

6.5. ALTERACIONES DE ALGUNOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DURANTE LA OBESIDAD Y DT2

Para ese trabajo se midieron cinco parámetros bioquímicos por su relevancia en obesidad y DT2. Estos fueron glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL. En este apartado se hablará de manera breve de cada uno de estos parámetros. Cabe aclarar que aún no existen niveles de referencia mundialmente aceptados para niños, debido a que, en esta etapa de desarrollo, los niveles de los parámetros bioquímicos tienden a modificarse de manera natural con la edad. Sin embargo,

algunos estudios han propuesto valores de referencia por rangos de edad, por lo que en esta tesis se presentarán los valores recomendados por dichos estudios.

La glucosa plasmática es un indicador de salud que se utiliza principalmente para el diagnóstico de DT2. En adultos los niveles normales de glucosa en ayunas deben ser menores a 126 mg/dL (45) y en niños se recomienda que sean menores a 100 mg/dL (56), de lo contrario se consideran alterados los niveles de glucosa (45).

El colesterol forma parte de las membranas celulares y se produce en el hígado. Una dieta con alimentos ricos en colesterol, grasas saturadas, grasas trans y grasa total puede afectar sus niveles de colesterol. Los niveles de colesterol altos contribuyen a la formación de placa en los vasos sanguíneos; este proceso se denomina aterosclerosis. La placa de colesterol dentro de las paredes de los vasos sanguíneos hace que estos se estrechen (enfermedad arterial coronaria), y aumenta su riesgo de ataque cardíaco y derrame cerebral. (57). En adultos, el nivel normal de colesterol total en ayuno, debe ser menor a 200 mg/dL (58), mientras que en niños se recomienda que debe ser menor a 170 mg/dL (59,60).

El colesterol es insoluble en agua y debe ser transportado en el torrente sanguíneo a través de lipoproteínas; de las cuales las principales son las LDL y las HDL. La principal función de las LDL es transportar el colesterol desde el hígado a los tejidos para incorporarlo en la membrana de las células. Sin embargo, las LDL crean “depósitos de grasa” en las paredes de las arterias. Por otro lado, las HDL retiran el colesterol de las arterias desde los tejidos del cuerpo, y lo transportan de vuelta al hígado para su excreción. Se ha asociado niveles altos de las LDL con el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad coronaria (61).

En adultos, el HDL en ayunas debe ser mayor a 40 mg/dL en hombres y mayor de 50 mg/dL en mujeres, mientras que para LDL deben ser menores a 100 mg/dL (45). En niños se recomienda que los niveles normales de HDL deben ser mayor a 45 mg/dL (56), y para LDL menores a 130 mg/dL (59).

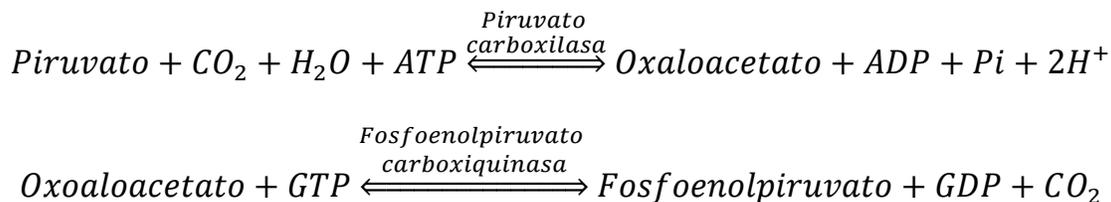
Los triglicéridos están compuestos por el glicerol y otros ácidos grasos. Los triglicéridos actúan como una fuente de almacenamiento de energía. Cuando los niveles de triglicéridos en sangre son altos, estos se depositan en los tejidos grasos, propiciando el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (60). En adultos los niveles normales de triglicéridos en ayunas deben ser menores a 150 mg/dL (45), mientras que en niños se recomienda que deben ser menores a 100 mg/dL (56).

6.6. GENES DE ESTUDIO

6.6.1. GEN *SIRT1*

Se ha descrito que *SIRT1* es una deacetilasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) que es capaz de eliminar a los grupos acetil de las histonas, así como de otros substratos. Participa en un amplio rango de funciones fisiológicas como en el control de la expresión de genes, el envejecimiento (62), la supervivencia celular, función cardiovascular, función neuronal, respuesta inflamatoria o de estrés y la homeostasis del metabolismo (16). En particular, *SIRT1* parece estar involucrado en la regulación de la gluconeogénesis (63–66) a través de la acción indirecta sobre la expresión del gen fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*PEPCK*),

enzima que se encarga de catalizar la reacción de conversión del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono (CO₂) (67), que se resumen a continuación:



En 2005 Rodgers y colaboradores (64), reportaron que durante el ayuno *SIRT1* activa *PGC-1 α* en el hígado, esto coactiva los factores de transcripción *FOXO1* y *HNF-4 α* que se unen a las zonas promotoras de los genes *PEPCK* y *G6Pase*, induciendo la gluconeogénesis (63). Sin embargo, en 2011, el grupo de Wang (65) reportó datos opuestos utilizando ratones. En este trabajo, encontraron que *SIRT1* activa la transcripción de RICTOR (componente del complejo mTORC2), desencadenando una cascada de fosforilación de AKT y FOXO1 que inhibe la síntesis de la G6Pase y PEPCK.

Por otra parte, se ha reportado que *SIRT1* modula la homeostasis de los lípidos a través de la represión de la transcripción de *PPAR γ* y sus genes blanco (68–70).

SIRT1 también incrementa la oxidación de ácidos grasos hepáticos (71), mejora las funciones celulares reduciendo la oxidación y el estrés del retículo endoplásmico (72), y puede inhibir la lipogénesis (73), mediante la regulación de proteínas intermediarias involucradas en estos procesos.

Aunque *PPAR γ* es el regulador principal del anabolismo de lípidos en el tejido adiposo, existen otros receptores nucleares que pueden realizar funciones similares

en otros tejidos y que responden a *SIRT1*. Entre ellos se encuentra *LXR* que es un potente estimulador del anabolismo de los lípidos (74,75).

El gen *SIRT1* se ha asociado a distintas enfermedades. En el caso de desórdenes cardiovasculares, se ha encontrado que la activación de *SIRT1* mediante resveratrol mejora la isquemia cardiaca y las funciones vasculares (76). También tiene una participación controversial en la progresión tumoral por su función dual de oncogén y supresor tumoral al deacetilar el residuo de lisina 282 de p53 (77). Por otro lado, también se ha encontrado evidencia que muestra que *SIRT1* juega un papel importante en la fisiología y patología neuronal, ya que modula la formación de la memoria, la plasticidad sináptica y la función cognitiva (74).

Stephen J. y colaboradores (78) reportaron en su estudio, que los niveles de expresión del mRNA se encuentran elevados en tejido adiposo subcutáneo de personas delgadas, en comparación con personas que presentan obesidad. La expresión del RNA mensajero de *SIRT1* está inversamente correlacionada con el IMC, sin embargo, no encontraron asociación entre estos polimorfismos (rs33957861, rs737477, rs2236318, rs10823103, rs12413112, rs11599176, rs10997865, rs11596401, rs35689145, rs33955981, rs2234975) y la expresión de *SIRT1*.

En 2010, se reportó que el alelo T del rs3758391 en el gen *SIRT1* (Figura 6) se asocia con la DT2, y que puede estar alterando la función de *SIRT1* como regulador de la gluconeogénesis y la secreción de la insulina (79).



Figura 6. El SNP rs3758391 se localiza en la región promotora del gen SIRT1 (80).

6.6.2. GEN CAPN10

Las calpaínas son cisteínas proteasas citoplasmáticas que requieren iones calcio para su actividad. Están implicadas en una variedad de procesos celulares, como la transducción de señal, proliferación celular, regulación del ciclo celular, diferenciación celular, apoptosis, fusión membranal y activación plaquetaria (81). El número de proteínas que pertenecen a esta familia es alrededor de 14 y están codificadas en genes independientes (82–84).

Las funciones precisas de *CAPN10* en el metabolismo de la glucosa, obesidad o DT2 aún no están totalmente claras. Sin embargo, existe evidencia de que *CAPN10* participa en la exocitosis de la insulina, ya que la sobreexpresión de este gen en las células β -pancreáticas, incrementa la secreción de la insulina dependiente de calcio al proteolizar la proteína SNAP-25 que se encarga de fusionar las vesículas que contienen la insulina almacenada con la membrana de la célula (85), como se muestra en la Figura 7. Por otra parte, existen trabajos que han reportado variantes de *CAPN10* que han sido asociadas con DT2, por ejemplo el SNP-44 (rs2975760), SNP-43 (rs3792267) y SNP-19 (rs3842570) (17), con obesidad como el SNP-43 (rs3792267) y el SNP-19 (rs3842570) (18,19) así como con el síndrome metabólico (20,21).

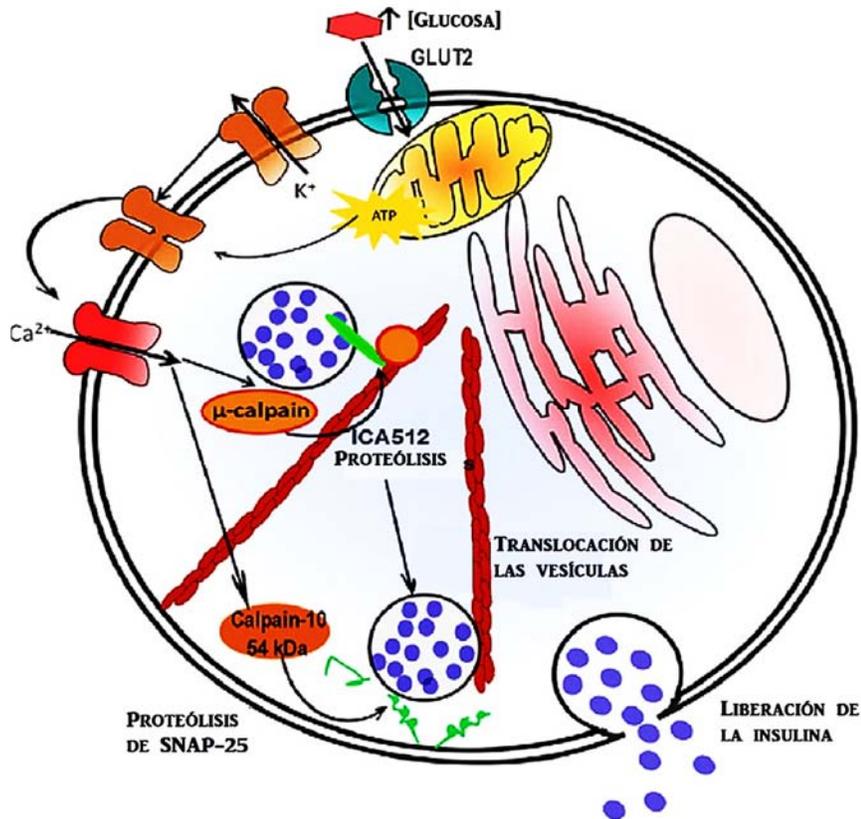


Figura 7. La isoforma 54kDa de CAPN10 proteoliza SNAP-25, (proteína que participa en la fusión de las vesícula), en respuesta al flujo de calcio al medio intracelular, dando como resultado la liberación de la insulina (85).

Sin embargo, Sreenan y colaboradores reportaron en el 2001 (86) que la calpaína 10 también tiene efectos sobre el tejido adiposo y en el músculo esquelético de las ratas. Ellos demostraron que la inhibición de calpaína disminuye la captación de glucosa por una estimulación de la insulina. Su propuesta es que *CAPN10* está implicado en la translocación de las vesículas del transportador de glucosa 4 (GLUT4), a la membrana plasmática a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, todo esto mediado por la estimulación de los receptores de insulina en la célula.

En el 2004, Carlsson y su grupo de estudio (18), describen que la reducción de la expresión de *CAPN10* puede ser un factor de riesgo para el síndrome metabólico en pacientes con obesidad, aunque en su estudio encontraron que la variación en la expresión de este gen en tejido adiposo no parece contribuir al riesgo de desarrollar obesidad por sí mismo.

Yuichiro Sato y colaboradores reportaron en 2003 (87), que los niveles del transcrito del gen *CAPN10* en leucocitos, están significativamente disminuidos en ratas que presentan diabetes inducida por obesidad comparado con los animales control. Esta tendencia fue encontrada en la mayoría de los tejidos blanco de insulina. Sato sugirió, que la expresión génica en sangre puede ser utilizada como un sistema útil para predecir la DT2 antes de su aparición, y que *CAPN10* representa un gen candidato para la predicción de DT2 en el ser humano.

En un estudio realizado en 2002 por Orho-Melander y colaboradores (88), se describe que los genotipos GG y GT del SNP-43 (rs3792267) (Figura 8) están asociados con la elevación del índice HOMA-IR y valores altos de los ácidos grasos libres en personas con DT2. Tiempo después, en 2006, Pihlajamaki y colaboradores (89), encontraron que el mismo polimorfismo se asocia con una elevada circunferencia de cintura y niveles altos de insulina en pacientes con DT2.

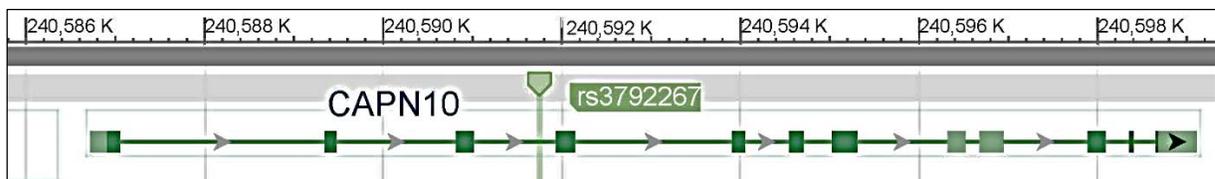


Figura 8. El polimorfismo SNP-43 (rs3792267) se localiza en la sección intrónica del gen *CAPN10* (80).

6.6.3. GEN VEGFA

Las proteínas de la familia VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), son proteínas de señalización, con participación en la vasculogénesis (formación *de novo* del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). Esta familia incluye a VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento placentario (PLGF) (90). El gen VEGFA participa de tres maneras en el desarrollo vascular: 1) inicia la angiogénesis, promoviendo la proliferación y quimioatracción de las células endoteliales, 2) mantiene la viabilidad de vasos sanguíneos inmaduros y 3) facilita el recubrimiento del vaso con pericitos (91–93).

VEGFA regula el desarrollo y la homeostasis de los vasos sanguíneos y linfáticos y su expresión en células endoteliales, hematopoyéticas y células del estroma, aumenta en respuesta de la presencia de hipoxia en los tejidos y por la estimulación de factores de crecimiento como $TGF\beta$, interleucinas o factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) (94).

En el 2012, Kai Sun y colaboradores (24) reportaron resultados paradójicos en el metabolismo de ratones al modular la expresión de VEGFA. En primer lugar, la sobreexpresión de VEGFA en los adipocitos resulta en una disminución de la hipoxia, un mayor consumo de oxígeno, una disminución de los niveles de ácidos grasos libres y triglicéridos en suero y en el hígado, así como un incremento de los niveles de PGC α y UCP-1, proteínas importantes encargadas de la producir energía en forma de ATP y calor. En segunda instancia, al inhibir la expresión de VEGFA en tejido adiposo, se observa una disminución de los factores de inflamación, una

mejora en la sensibilidad a la insulina, y un aumento de la incidencia de la muerte de los adipocitos.

Por el contrario, existen estudios que describen una asociación entre polimorfismos del gen *VEGFA* que se encuentran en la región 5'UTR o en la región promotora del gen *VEGFA* y el riesgo a desarrollar retinopatía diabética. Por ejemplo, en el 2013, Yan Lu (95) encontró que hay una asociación significativa entre el polimorfismo rs699947 del gen *VEGFA* y el riesgo a desarrollar retinopatía diabética. Por su parte, Xiufen Yang en 2011 (96) sugirió que los SNPs rs699947, rs833061 y rs13207351 localizados de igual manera en la región promotora del gen *VEGFA*, están igual asociados con esta complicación diabética en población china.

En un estado de obesidad severa, al presentarse hipoxia local en el tejido adiposo, los adipocitos secretan *VEGFA* para inducir la angiogénesis, promoviendo así la circulación del oxígeno, nutrientes, hormonas y factores de crecimiento a través de los capilares en el tejido adiposo (23,97). Por lo que se espera encontrar que los niveles de transcrito de *VEGFA* se encuentren elevados en sangre periférica de niños con obesidad.

De acuerdo a lo anterior, en este estudio, analizaremos la asociación del rs25648 localizado en la región 5'-UTR del gen *VEGFA* (Figura 9), con los parámetros antropométricos, bioquímicos y su expresión del gen *VEGFA*. Un análisis *in silico* con softwares especializados (98–100) demostró que el polimorfismo rs25648 tiene una alta probabilidad de regular la transcripción de este gen. La sección en el que se encuentra este SNP en el DNA es reconocida por los promotores que dan inicio a dicho proceso (101).

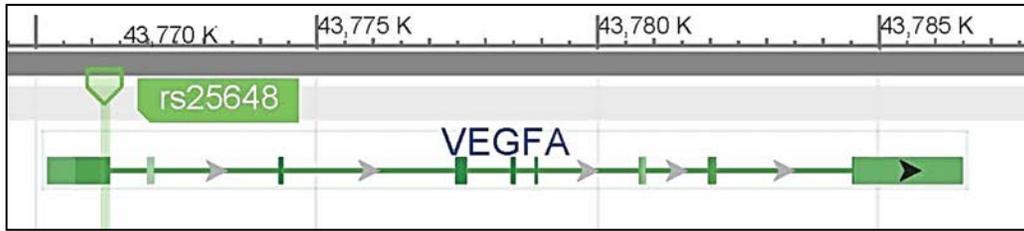


Figura 9. Localización del polimorfismo rs25648 cerca de la sección 5'-UTR del gen VEGFA (80).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los datos de la Asociación Internacional de Estudios de la Obesidad, se estima que aproximadamente mil millones de adultos presentan sobrepeso y 475 millones obesidad. Las muertes anuales en el mundo atribuidas a este padecimiento son de 2.8 millones de personas (102). Aunado a esto, estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que el número de personas con diabetes en el mundo se ha incrementado de 30 millones en 1995 a 347 millones en la actualidad y se estima que para el 2030 habrá 366 millones. Se calcula que en 2004 fallecieron 3.4 millones de personas por esta causa (103). Por lo anterior, la diabetes, el sobrepeso y la obesidad son considerados problemas importantes de salud pública, cuyo impacto en términos económicos, sociales y en la calidad de vida, las convierte en un tema que debe ser atendido con prioridad. La presencia de obesidad desde la niñez y la adolescencia confiere una mayor probabilidad de desarrollar DT2 en la edad adulta (7), por lo que es importante estudiar los factores genéticos de riesgo de DT2 desde edad temprana.

La DT2 es una enfermedad heterogénea con un fuerte componente genético. Se han descrito al menos 70 genes que presentan SNP asociados a la DT2 y/o algún marcador característico de esta enfermedad (p. ej. dislipidemias, glucosa u obesidad) (79). En la mayoría de los casos se desconocen los cambios a nivel celular que ocurren cuando están presentes los polimorfismos, por lo que la función de los polimorfismos asociados debe comenzar a explorarse. Algunos de los procesos que pueden modificarse por la presencia de los SNPs son los nivel de expresión génica, el corte y empalme del mRNA, estabilidad y estructura del mRNA,

así como también la función de las proteínas, cambio de aminoácidos y plegamiento de proteínas (104).

En este trabajo de tesis proponemos estudiar los cambios en la expresión génica debido a la presencia de tres SNP localizados en los genes *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA*; y su asociación con el diagnóstico de la obesidad, así como en los cambios con los parámetros bioquímicos, en una población infantil de la ciudad de México.

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre la expresión génica de *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA* con los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y diagnóstico de obesidad, así como con los polimorfismos rs3758391, rs3792267 y rs25648 en niños de 5-14 años.

8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el genotipo de 59 niños con diagnóstico de obesidad y 56 niños con peso normal del proyecto Genética de la Obesidad Infantil y Adolescente (GOIA), para los polimorfismos rs3758391, rs3792267 y rs25648.
- Determinar los niveles de expresión de *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA* en sangre periférica mediante PCR en tiempo real.
- Determinar la asociación entre la expresión de *SIRT1*, *CAPN10*, *VEGFA*, con los parámetros bioquímicos glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL; y genéticos.

9. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La expresión de los genes *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA* en una población infantil de la ciudad de México, podrá asociarse con algunos parámetros bioquímicos, genómicos y/o el diagnóstico de la obesidad.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1. DISEÑO DE ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO

- Analítico
- Casos y controles

POBLACIÓN DE ESTUDIO

- Niños y adolescentes de 6 a 14 años de edad de la zona metropolitana del Valle de México, que participaron en el estudio Genética de la Obesidad Infantil y Adolescente (GOIA)

VARIABLES:

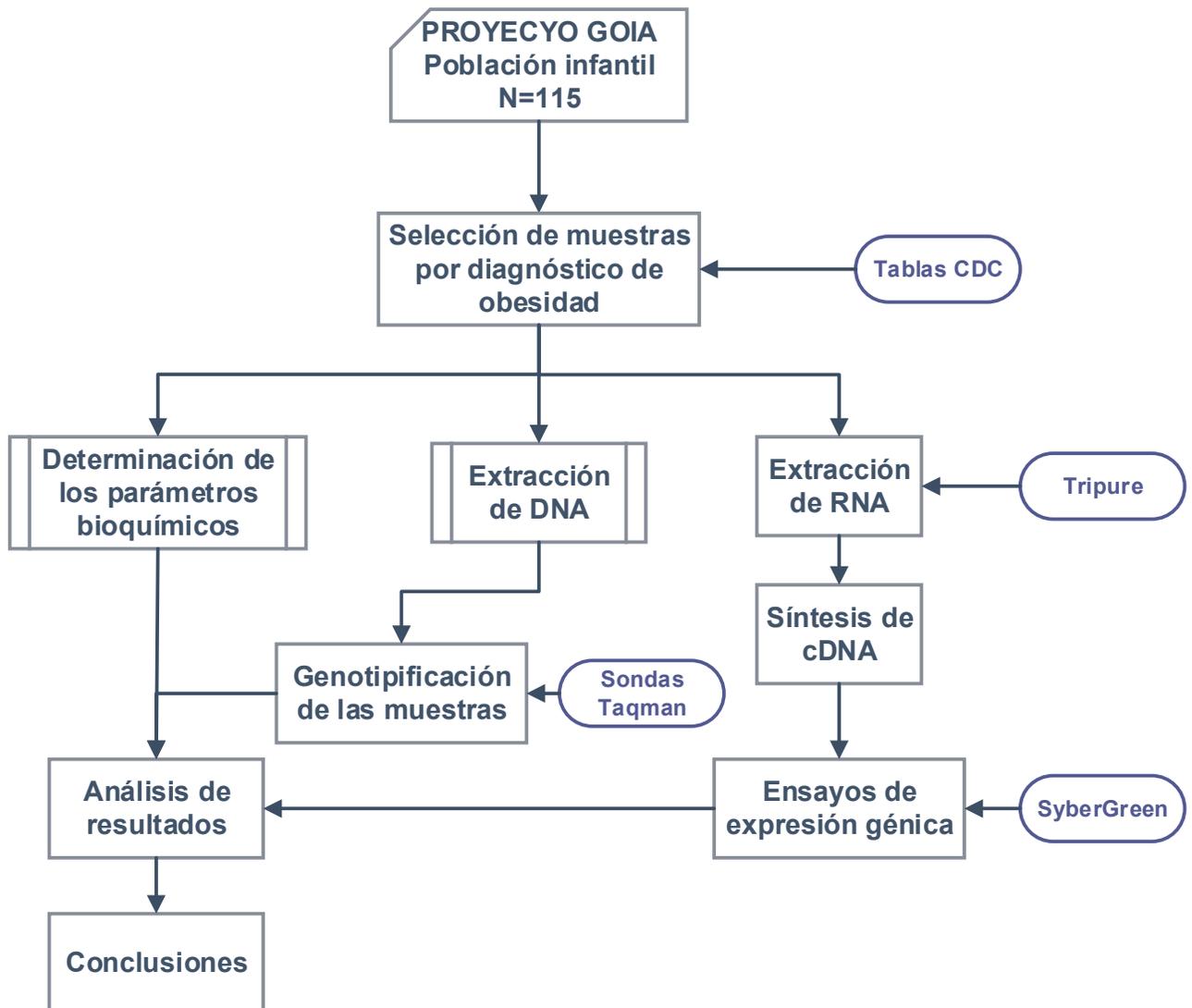
INDEPENDIENTE

- Genotipos del rs3758391, rs3792267 y rs25648
- Índice de Masa Corporal (IMC)
- Parámetros bioquímicos: glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL.

DEPENDIENTE

- Expresión de los genes *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA*

10.2. DIAGRAMA DE FLUJO



 Sección desarrollada por personal encargado del proyecto GOIA

 Reactivos utilizados

10.3. TOMA DE MUESTRA Y DATOS GENERALES

Las muestras utilizadas y los datos bioquímicos y antropométricos fueron tomados previamente por el personal de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica (UIMB) del IMSS de la siguiente manera: los niños acudieron a la Unidad Deportiva Morelos del Instituto Mexicano del Seguro Social acompañados por sus padres o tutores en donde se les dio una explicación de los objetivos del estudio. A los niños se les pidió que firmaran la carta de asentimiento informado y a los padres o tutores la carta de consentimiento informado. Posteriormente, se aplicó un cuestionario para conocer sus datos generales, estilo de vida, antecedentes clínicos y la historia familiar del niño. A continuación, se tomaron sus medidas antropométricas de peso, estatura, circunferencia de cintura, además de su presión arterial y una muestra de sangre periférica para determinar sus parámetros bioquímicos y extraer DNA y RNA. El protocolo de investigación GOIA fue aprobado por el Comité de Ética y de Investigación Científica del IMSS, con clave de registro FIS/IMSS/PRI0/10/011 (105). Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

10.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Niños con peso normal clínicamente sanos
- Niños con obesidad clínicamente sanos
- No emparentados
- Ambos sexos.
- Edades de 6 a 14 años.

10.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Niños que al momento del estudio presentaban:

- Alguna enfermedad infecciosa aguda
- Que sufran alguna enfermedad crónica como alergias y enfermedades autoinmunes.
- Que estén participando en un programa de reducción de peso, con o sin tratamiento farmacológico.

A partir de las muestras obtenidas en el estudio del proyecto GOIA, se seleccionaron de manera aleatoria 59 muestras de niños que presentaron peso normal y 56 muestras de niños que presentaron obesidad de acuerdo a la clasificación basada en las tablas de crecimiento de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para niños y niñas de 2-20 años de edad (43), como se muestran en la Tabla 1.

10.4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

Las determinaciones de glucosa, triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) se realizaron a partir de suero mediante fluorimetría, utilizando el equipo ILab 300 Plus (Instrumentation Laboratory®) y siguiendo las especificaciones recomendadas por el fabricante. El cual cuantifica dichos metabolitos haciéndolos reaccionar con reactivos para generar un compuesto colorido, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de analito (glucosa, triglicéridos, colesterol, etc.) presente en la muestra. En cuanto a los datos antropométricos, la edad y el sexo se obtuvieron de

cuestionarios aplicados a los niños; el peso, fue medido con una balanza digital de marca Seca; la estatura, con un estadiómetro Seca 225; y la circunferencia de la cintura, con una cinta métrica también de marca Seca. El IMC, se calculó utilizando, el sexo, la edad, el peso y la estatura; y se utilizó para diagnosticar obesidad, de acuerdo con las tablas de la CDC (43).

**Esta sección fue realizada por el personal encargado del proyecto GOIA*

10.5. ANÁLISIS IN SÍLICO

Se realizó una búsqueda en el sitio *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para buscar bibliografía que reportara genes y SNPs asociados en mexicanos a DT2 y sus complicaciones. Dichos SNPs fueron sometidos a una segunda selección por medio de un análisis in silico con los software: Pupasuite (99), F-SNP (98) y Haploreg V2 (100). Estos softwares nos permitieron elegir aquellos SNPs que pudieran encontrarse con mayor probabilidad en potenciadores, silenciadores y regiones promotoras. Estos elementos juegan un papel importante en la regulación de la transcripción. Los SNPs elegidos fueron los siguientes SNP: rs3758391 (*SIRT1*), rs3792267 (*CAPN10*), y rs25648 (*VEGFA*).

10.6. EXTRACCIÓN DEL DNA

A partir de un tubo de EDTA que contenía 6 mL de sangre se realizó la extracción de DNA en el equipo automatizado Flex Star (Autogen®). Se colocó el *buffy coat* en tubos especiales para el equipo, se agregó solución de lisis y centrifugó para obtener el sobrenadante. El DNA se precipitó con isopropanol y se llevó a cabo un

lavado con etanol al 70%. Se resuspendió la pastilla con el DNA genómico en buffer TE. La integridad del DNA se verificó en geles de agarosa al 1% y la concentración se determinó mediante el espectrofotómetro Epoch (BioTek®). El DNA se almacenó en tubos eppendorf a -70°C hasta su uso.

**Esta sección fue realizada por el personal encargado del proyecto GOIA*

10.7. EXTRACCIÓN DEL RNA

Para llevar a cabo la extracción de RNA, se mezclaron 300 µL de sangre total con 3.0 mL de Tripure. Se homogenizó en un agitador vórtex durante 5 minutos y posteriormente se incubó otros 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 800 µL de cloroformo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Al término de la incubación, se centrifugó y se separó la fase acuosa a la cual se le adicionaron 500 µL de Isopropanol frío y se mezcló por inversión. Se dejó precipitar el RNA toda la noche a -70°C con isopropanol. Posteriormente, se centrifugó para obtener el paquete de RNA y se eliminó el isopropanol. El paquete de RNA se lavó con etanol al 70% y posteriormente se resuspendió con 15 µL de agua DEPC.

La integridad del RNA se verificó mediante un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La concentración del RNA se midió en el espectrofotómetro Epoch (BioTek®) y posteriormente se guardó a -72°C.

10.7.1. TRATAMIENTO CON DNasa DEL RNA

Para eliminar el DNA residual de las muestras de RNA, se utilizó el kit *DNase I, RNase-free* (Thermo SCIENTIFIC®). En un tubo eppendorf se colocó 1µg de RNA,

1µL de DNasa y 1µL de buffer de reacción. Se agregó agua DEPC estéril para completar un volumen final de 10 µL. Se centrifugó durante unos segundos y posteriormente se encubó la reacción en el termociclador THERM-1000 (Axygen®) a 37°C durante 30 minutos. Se inhibió la actividad de la enzima agregando 1 µL de EDTA a 50mM, e incubando a 65°C durante 10 minutos.

10.7.2. OBTENCIÓN DE cDNA

Después del tratamiento con DNasa, se sintetizó el cDNA utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®) (106).

Para sintetizar el cDNA, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 2 µL de buffer de reacción, 0.8 µL de dNTP's, 2 µL de los *Random Primers* y 1 µL de la enzima *Transcriptasa Reversa*. Se añadió esta mezcla a los 10 µL de RNA y se llevó a un volumen final de 20 µL con agua DEPC estéril. Se centrifugó el contenido del tubo y se incubó la reacción en un termociclador THERM-1000 (Axygen®) de acuerdo a la Tabla 2:

Tabla 2. Condiciones de temperatura para la síntesis de cDNA (106)

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso en los ensayos de expresión.

10.8. GENOTIPIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para llevar a cabo la genotipificación de las muestras, se utilizó el reactivo *TaqMan Universal Master Mix II 2X* (Applied Biosystems®) (107) y el equipo 7900HT Fast

Real-Time PCR System. Se utilizaron sondas TaqMan para la discriminación alélica con la información de la Tabla 3.

Tabla 3. Sondas TaqMan de los polimorfismos SIRT1, CAPN10 y VEGFA utilizadas en la genotipificación de la población (108)

Gen	SNP ID	ID de la sonda	Fluoróforos marcados	
			VIC	FAM
<i>SIRT1</i>	rs3758391	C_3003909_10	C	T
<i>CAPN10</i>	rs3792267	C_27483762_10	A	G
<i>VEGFA</i>	rs25648	C_791476_10	C	T

Se colocaron en una placa de 384 pozos específica para el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System los siguientes reactivos: 50 ng de DNA, 3 µL del reactivo TaqMan Universal Master Mix II, 0.5 µL de las sondas TaqMan marcados con los fluoróforos VIC y FAM que identificaron de manera específica el alelo ancestro y variante del polimorfismo en el DNA. Se llevó a un volumen final de 5µL con agua DEPC.

Se centrifugó la placa y la reacción se corrió en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System con las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones de PCR (107)

	Incubación	Activación de la polimerasa	PCR	
			40 Ciclos	
			Desnaturalizar	Alinear/ampliar
Temperatura (°C)	50	95	95	60
Tiempo (mm:ss)	02:00	10:00	00:15	01:00
Volumen de Reacción	5µL			

Para el análisis de los resultados, se emplearon los softwares SDSv2.4 Standard (Life Technologies®) y TaqMan® Genotyper Software (Life Technologies®).

10.9. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

10.9.1. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñaron oligonucleótidos con la finalidad de determinar la expresión de los genes *CAPN10*, *VEGFA*, *SIRT1* (Tabla 5). El software utilizado fue el Primer-BLAST (NCBI) (109). Los oligonucleótidos se diseñaron de tal manera que:

- ✓ Cada primer tuviera una longitud entre 18-24 bases.
- ✓ El contenido de G-C se encontrara en un intervalo de 40-60%.
- ✓ La temperatura de alineamiento (T_m) estuviera en un intervalo de 57-63°C.
- ✓ La diferencia de temperatura de alineamiento entre cada par de oligonucleótidos no debía ser mayor a 3°C.
- ✓ El amplicón tuviera una longitud de 60 a 250 bases.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica (108).

GEN	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Longitud del oligonucleótido (n)	T_m (°C)	Longitud del producto (pb)
<i>SIRT1</i>	Directo	ACAGGTTGCGGGAATCCAAA	20	60.18	155
	Inverso	GTCATCAGCTGGGCACCTA	20	59.75	
<i>CAPN10</i>	Directo	GTCCTACGAGCACCTGTGG	19	59.78	99
	Inverso	CTCCTGCTACGCCCTTCAG	20	60.46	
<i>VEGFA</i>	Directo	CAGAAGGAGGAGGGCAGAATC	21	59.90	250
	Inverso	TGGTGAGGTTTGATCCGCATA	21	59.40	
<i>PGK1</i>	Directo	CAAGAAGTATGCTGAGGCTGTCA	23	60.60	68
	Inverso	CAAATACCCCCACAGGACCAT	21	59.70	

(pb) = pares de bases, (n) = nucleótidos

El gen *PGK1* fue utilizado como gen endógeno para este estudio, ya que en base a la literatura, es un gen con expresión estable en sangre periférica (110).

10.9.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR

Se estandarizaron las condiciones de la PCR así como las concentraciones adecuadas de los oligonucleótidos de acuerdo a la Tabla 6. La estandarización se llevó a cabo mediante reacciones de PCR de punto final, empleando el reactivo *TaqMan Universal Master Mix II 2X* (Applied Biosystems®) (107) en el termociclador THERM-1000 (Axygen®). Se corrieron los productos de las reacciones en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 6. Concentraciones de los oligonucleótidos de los genes *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA* utilizadas para los ensayos de expresión.

	<i>SIRT1</i>	<i>CAPN10</i>	<i>VEGFA</i>	<i>PGK1</i>
Oligonucleótido Forward	0.3 μ M	0.3 μ M	0.05 μ M	0.3 μ M
Oligonucleótido Reverse	0.05 μ M	0.3 μ M	0.3 μ M	0.3 μ M

10.9.3. REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL

Para medir la expresión génica de las muestras de RNA de los sujetos de estudio, se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando el reactivo *Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Thermo scientific®) (111).

En una placa de 384 pozos, se colocaron en cada pozo 20 ng de cDNA de las muestras, 2.5 μ L del reactivo SYBR® Green, y 0.5 μ L de cada oligonucleótido. La reacción se llevó a un volumen final de 5 μ L con agua DEPC estéril. Se centrifugó la placa y se corrió la reacción en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System de acuerdo a las condiciones descritas en la Tabla 4.

Todas las muestras se corrieron por triplicado para cada gen, y se llevó a cabo la normalización usando *PGK1* como gen endógeno.

10.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el método de cuantificación relativa para analizar el cambio de expresión de los genes bajo estudio. Se calculó el C_t de la reacción de PCR en tiempo real para cada muestra del gen problema y del gen endógeno. Posteriormente se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores C_t de la muestra y los valores C_t del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(\Delta C_{t\text{muestra}} - \Delta C_{t\text{control}})}$$

$$\Delta C_t = C_{t\text{Gen problema}} - C_{t\text{Gen endogeno}}$$

Para el análisis de la expresión comparada con los tres distintos genotipos de los polimorfismos, se utilizó la prueba de ANOVA, mientras que para la comparación de la expresión de los genes con los parámetros bioquímicos se utilizó la prueba de T de Student. El software utilizado para el análisis estadístico fue el Prism® v6.0 (GraphPad®).

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se empleó una muestra de 115 niños con edades entre 5 y 14 años. 59 niños presentaron peso saludable y los 56 restantes obesidad. En la Tabla 7 se muestran los valores de los parámetros bioquímicos y antropométricos de la población estudiada. Se observó diferencia significativa en los datos antropométricos de IMC ($16.5 \pm 0.2 \text{ kg/m}^2$, $24.7 \pm 0.4 \text{ kg/m}^2$; $p < 0.0001$) y circunferencia de la cintura ($57.5 \pm 0.7 \text{ cm}$, $78.5 \pm 1.3 \text{ cm}$; $p < 0.0001$) entre los niños que tienen peso normal en comparación con los niños con obesidad. Los niños con obesidad presentan un aumento de manera significativa en los niveles de triglicéridos ($78 \pm 4 \text{ mg/dL}$; $126 \pm 10 \text{ mg/dL}$, $p < 0.0001$) y en los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ($107 \pm 3 \text{ mg/dL}$; $118 \pm 4 \text{ mg/dL}$, $p = 0.02$), y disminución de los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) ($57 \pm 2 \text{ mg/dL}$; $50 \pm 2 \text{ mg/dL}$, $p = 0.001$) en comparación con los niños con peso normal. A pesar de ello, el valor promedio de triglicéridos en niños con obesidad ($126 \pm 10 \text{ mg/dL}$) es superior al recomendado en población infantil que es de 100 mg/dL (56). Los triglicéridos aumentan el riesgo de desarrollar DT2, enfermedades cardiovasculares (60). Esto aunado con bajos niveles de HDL y LDL aumentados, significa un aumento en el riesgo de que estos niños presenten estas enfermedades desde la adultez temprana. Por otro lado, no encontramos diferencia significativa entre los niveles de glucosa ($86.4 \pm 1.1 \text{ mg/dL}$, $85.5 \pm 1.1 \text{ mg/dL}$; $p = 0.59$) y colesterol total ($169 \pm 4 \text{ mg/dL}$, $179 \pm 5 \text{ mg/dL}$; $p = 0.09$) entre los grupos de niños con peso normal y obesidad, respectivamente. Estos valores de colesterol están en el límite recomendado para la población infantil (170

mg/dL (59)), lo que indica que la población de estudio ya presenta un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

Tabla 7. Parámetros bioquímicos y antropométricos de la población de niños.

	Peso normal	Obesidad	p	Total	Valores de Referencia
n	59	56		115	
Edad (años)	8.5 ± 0.2	9.0 ± 0.2	0.18	8.7 ± 1.8	
IMC (Kg/m ²)	16.5 ± 0.2	24.7 ± 0.4	< 0.0001	20.5 ± 4.8	
Cintura (cm)	57.5 ± 0.7	78.5 ± 1.3	< 0.0001	67.7 ± 12.9	
Glucosa (mg/dL)	86.4 ± 1.1	85.5 ± 1.1	0.59	86.0 ± 8.5	< 100
Colesterol total (mg/dL)	169 ± 4	179 ± 5	0.09	174 ± 31	< 170
Triglicéridos (mg/dL)	78 ± 4	126 ± 10	< 0.0001	102 ± 61	< 100
HDL (mg/dL)	57 ± 2	50 ± 2	0.001	53 ± 13	> 45
LDL (mg/dL)	107 ± 3	118 ± 4	0.016	112 ± 25	< 130

La información se expresa en promedios ± SD. El valor de p se obtuvo de un análisis mediante T de Student, α=5%. Los valores de referencia para glucosa, triglicéridos, HDL (56), LDL (112) y colesterol (59) son los recomendados para una población infantil.

11.2. EXTRACCIÓN DE DNA Y RNA

La electroforesis en geles de agarosa de las muestras de DNA y RNA mostró que el material genético tenía una integridad adecuada para los estudios (Figura 10 y 11). Las bandas se observaron nítidas y sin rastros de material degradado. En el gel de RNA se observaron las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal. Las concentraciones de las muestras de DNA se encontraron en el intervalo de 150 ng/μL a 500 ng/μL, mientras que las muestras de RNA se encontraban en el intervalo de 100 ng/μL a 300 ng/μL. Estas concentraciones fueron adecuadas para la genotipificación y análisis de la expresión mediante sondas *TaqMan* y *SyberGreen* respectivamente.

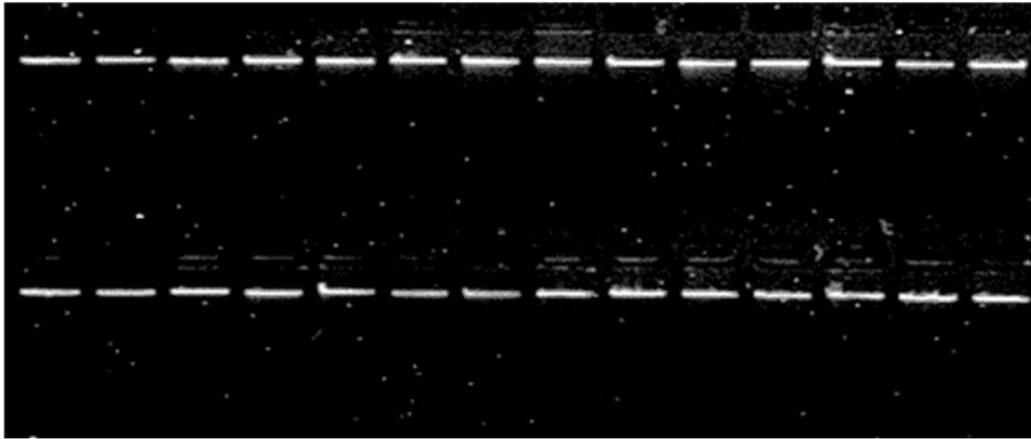


Figura 10. Algunas de las muestras de DNA de sangre periférica de los niños utilizadas en este estudio. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

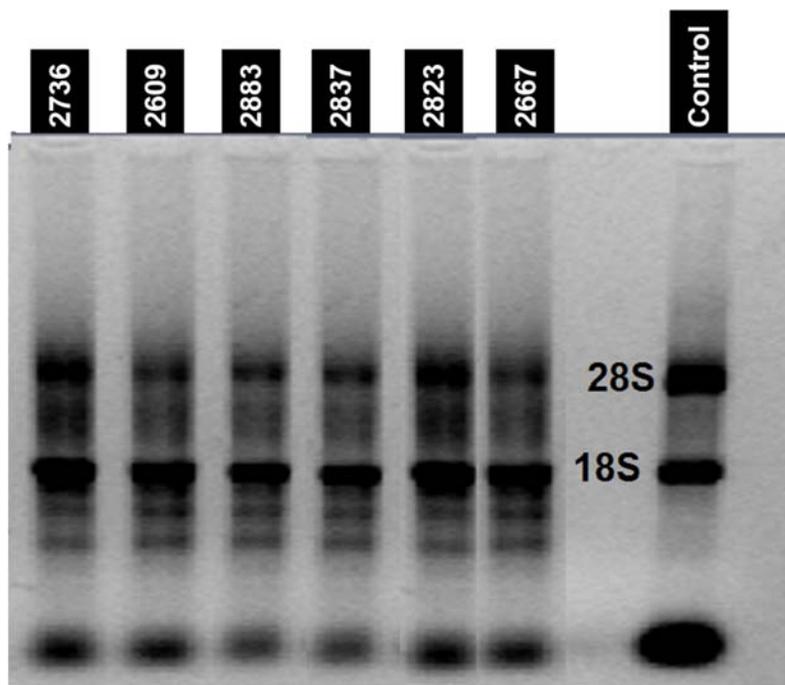


Figura 11. Algunas de las muestras de RNA extraídas de sangre periférica de los niños para este estudio. Gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio.

11.3. *SIRT1*

Se genotipificó el rs3758391 que se encuentra localizado 1085 bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *SIRT1*, en muestras provenientes de 115

niños. Los genotipos encontrados se distribuyeron de la siguiente manera: 7 homocigotos para el alelo variante (CC), 58 heterocigotos (CT) y 33 homocigotos para el alelo ancestro (TT) (Figura 12). Esto corresponde a un 7.1%, 59.2% y 33.7% respectivamente.

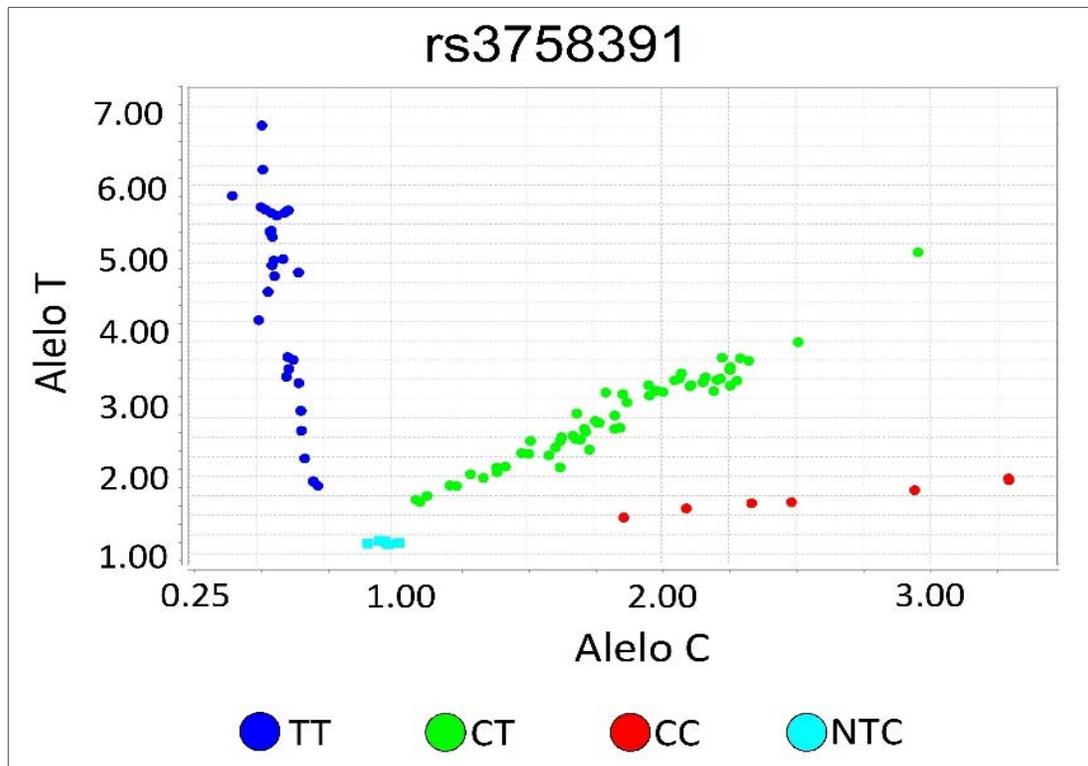


Figura 12. Genotipificación del rs3758391 localizado en el gen *SIRT1*. n=98.

Se realizó la extracción del RNA de 8 homocigotos TT y 5 homocigotos CC con la finalidad de comparar la expresión de *SIRT1* por genotipo. Este análisis mostró que los niños con el genotipo TT presentan una elevación de la expresión de *SIRT1* de aproximadamente dos veces la observada en niños con el genotipo CC (1.99 ± 0.68) (Figura 13). El valor de p al comparar los datos resultó significativo ($p = 0.02$).

Estudios anteriores (79) han evidenciado que el alelo T del rs3758391 se asocia con DT2 en adultos mexicanos. Estos resultados sugieren que esta asociación es consecuencia de modificaciones en la expresión de *SIRT1* por la presencia del polimorfismo de riesgo.

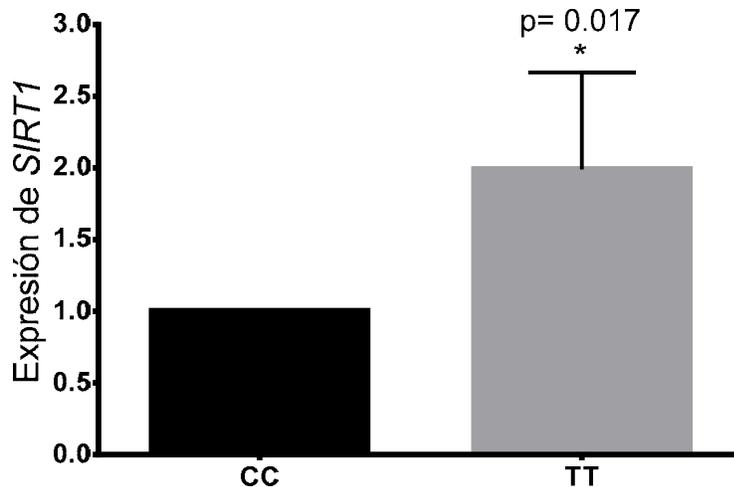


Figura 13. La expresión de *SIRT1* es mayor en niños que presentan el genotipo TT (1.99 ± 0.68 , $n = 8$) en comparación a los niños con el genotipo CC ($n = 5$). $p=0.017$

A la fecha, varios estudios han reportado que el aumento en la expresión de *SIRT1* promueve la oxidación de los ácidos grasos (71), inhibe la lipogénesis (73) y regula la gluconeogénesis (63–66). Sin embargo, existen otros trabajos que indican que *SIRT1* activa PEPCCK, el cual es elemento clave en la gluconeogénesis. De esta manera, la activación de PEPCCK por parte de *SIRT1*, puede producir hiperglucemia y desarrollar así con el tiempo, una resistencia a la insulina, y a DT2 (113).

Nuestros resultados apoyan esta última hipótesis ya que el alelo de riesgo en el SNP rs3758391 aumenta la expresión de *SIRT1* en sangre periférica, lo cual activaría la gluconeogénesis en hígado a través de PEPCCK. Por otra parte, es

importante determinar si el alelo T tiene el mismo efecto la expresión de *SIRT1* en todos los tejidos, o si su expresión es tejido dependiente.

De igual manera se investigó si la expresión de *SIRT1* esta correlacionada con el peso de los niños. Sin embargo, no encontramos una diferencia significativa entre estos dos grupos ($1.0, 0.79 \pm 0.23$; $p = 0.11$) (Figura 14), a pesar de que trabajos previos realizados en una población sueca (78) reportaron que la expresión de *SIRT1* en tejido adiposo esta inversamente correlacionada con el IMC. Mencionan que es posible que la proteína de *SIRT1* influye en la susceptibilidad a padecer obesidad a través de la regulación de la expresión de genes como *PPARGC1A*, *PPARG* y *ADIPOQ*, que regulan el metabolismo de la glucosa y los lípidos.

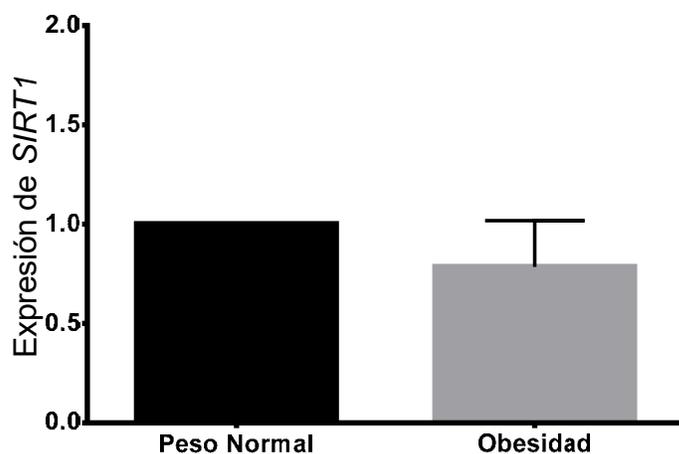


Figura 14. La expresión de *SIRT1* en niños con obesidad (0.79 ± 0.23 , $n = 8$) no muestra diferencia significativa con la expresión de este gen en niños con peso normal ($n = 8$). $p = 0.11$.

Cuando las muestras se agrupan por genotipos, no se encontró diferencia significativa con los valores de los parámetros bioquímicos glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL) de las muestras agrupadas por genotipo para el rs3758391.

	rs3758391				Valores de referencia
	CC	CT	TT	p	
n	8	58	33		
Glucosa (mg/dL)	84.1 ± 2.6	85.0 ± 1.3	85.9 ± 1.6	0.89	< 100
Colesterol total (mg/dL)	176 ± 8	170 ± 4	169 ± 6	0.86	< 170
Triglicéridos (mg/dL)	107 ± 14	100 ± 8	93 ± 8	0.77	< 100
HDL (mg/dL)	57 ± 5	55 ± 2	51 ± 2	0.30	> 45
LDL (mg/dL)	120 ± 7	109 ± 3	108 ± 4	0.36	< 130

La información se expresa en promedios ± SD resultado de un análisis estadístico de ANOVA.

La comparación de la expresión génica de *SIRT1* entre los niños con valores normales y aquellos fuera de rango de los parámetros bioquímicos de colesterol total (1.20 ± 0.13 mg/dL, 0.96 ± 0.19 mg/dL; $p = 0.30$) y triglicéridos (1.08 ± 0.13 mg/dL, 1.07 ± 0.31 mg/dL; $p = 0.97$), no muestran diferencia significativa.

11.4. CAPN10

Se han reportado variaciones en el gen *CAPN10* que se asocia con el desarrollo de la DT2 en población México-Americana (114). Uno de estos SNP es el rs3792267, también conocido como SNP-43, que se localiza en el intrón 3 del gen *CAPN10*. La genotipificación de las muestras estudiadas en este trabajo nos permitió determinar que las frecuencias genotípicas se distribuyen de la siguiente manera: 7 homocigotos para la variante AA (9.0 %), 29 homocigotos para el ancestro GG (37%), y 42 heterocigotos GA (54%). (Figura 15).

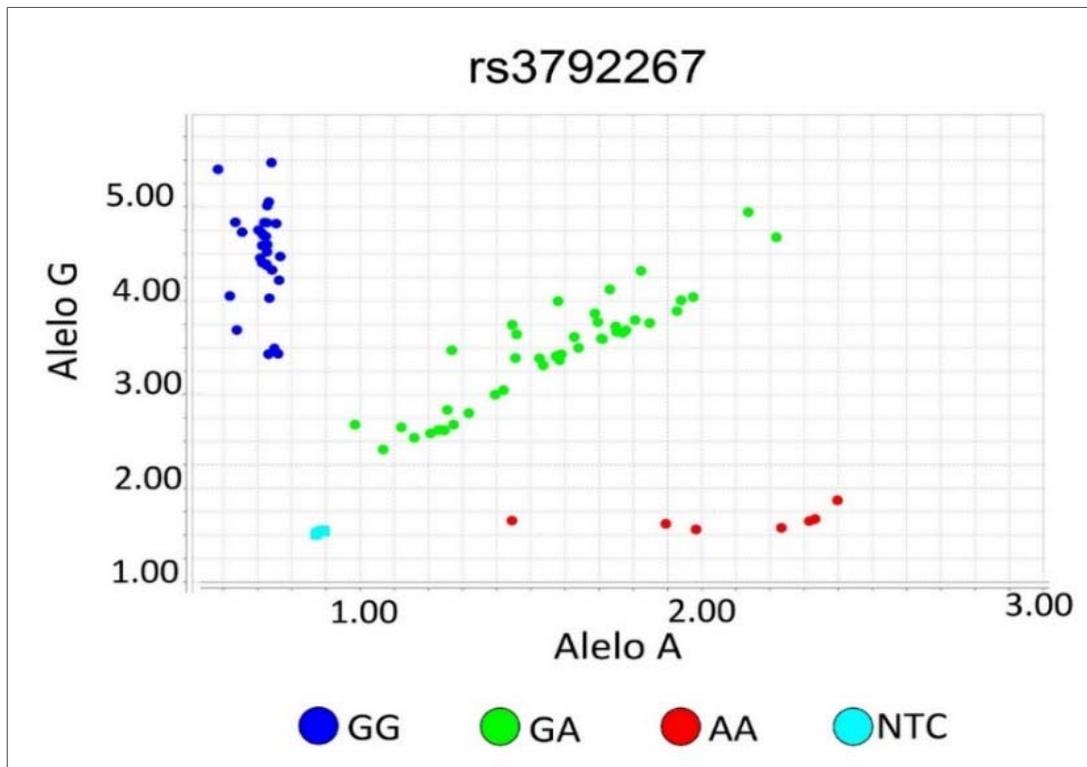


Figura 15. Genotipificación del SNP rs3792267 localizado en el gen CAPN10.

Debido a la baja frecuencia de homocigotos por el alelo A (variante) en la población estudiada se realizó la extracción de RNA de 7 homocigotos para el ancestro y 9 heterocigotos en el rs3792267. Al comparar la expresión génica entre estos grupos no encontramos diferencia significativa (0.67 ± 0.67 , 1.0; $p = 0.13$) (Figura 16).

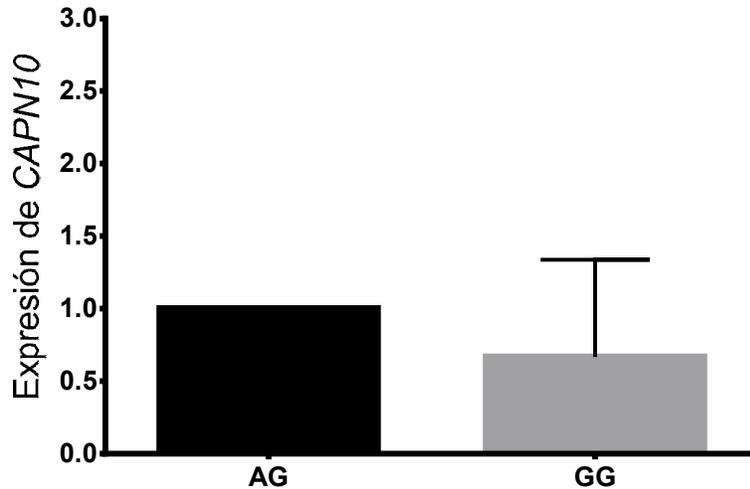


Figura 16. La expresión de CAPN10 en niños con genotipo GG (0.67 ± 0.67) del SNP rs3792267 no muestra diferencia significativa en comparación con los niños que presentan el genotipo AG. $p = 0.13$

En un trabajo previo realizado por Carlsson y colaboradores (18), se reportó que las personas con el genotipo GG presenta niveles menores de CAPN10 en tejido adiposo, en comparación a los que presentan el genotipo AA. Por lo que el aumento de nuestro tamaño de muestra sería necesario para poder corroborar estos hallazgos en sangre periférica en la población infantil mexicana.

Por otro lado, se comparó la expresión del gen CAPN10 entre las muestras provenientes de niños con obesidad y niños con peso normal. Los niños con obesidad presentaron una disminución de la expresión del gen CAPN10 en comparación a los niños con peso normal (0.25 ± 0.19 ; $p = 0.0002$) (Figura 17).

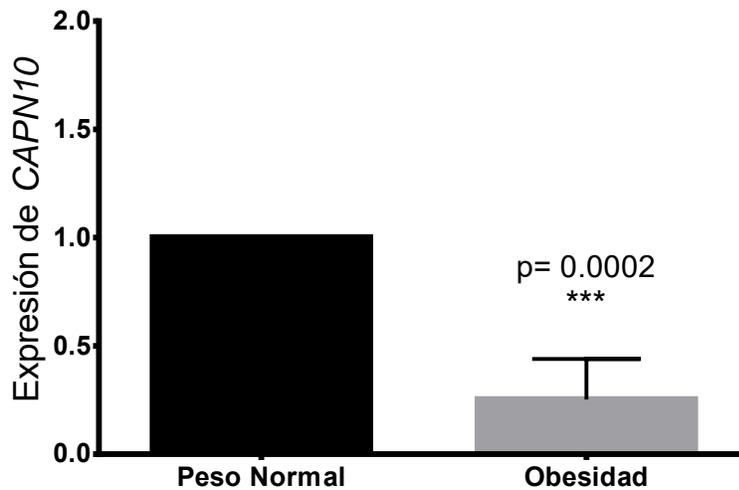


Figura 17. La expresión de CAPN10 es menor en niños diagnosticados con obesidad (0.25 ± 0.19 , $n = 9$) en comparación a los niños con peso normal ($n = 8$). $p = 0.002$

Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Mendoza-Lorenzo P. y colaboradores en el 2013 en población pediátrica mexicana (115).

Estudios reportados en la literatura indican que la baja transcripción de *CAPN10* puede afectar la capacidad de liberar insulina en las células β -pancreática, mientras que en musculo adiposo y esquelético, disminuye la captación de glucosa como consecuencia de la translocación deficiente de GLUT4 desde el citoplasma a la membrana celular. La alteración de estos mecanismos de translocación de GLUT4 en los individuos con obesidad, provocaría un incremento de glucosa en sangre periférica, lo que se conoce como hiperglucemia, y de esta manera ser uno de los factores que contribuyen al desarrollo de DT2.

Cuando las muestras se agrupan por genotipos, no se encontró diferencia significativa entre los valores de los parámetros bioquímicos de glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL (Tabla 9). Estudios anteriores han mostrado que el alelo G del polimorfismo rs3792267 se asocia con niveles altos de triglicéridos en

personas adultas con obesidad de población sueca (18) y elevación de ácidos grasos libres en personas adultas de una población de Finlandia (88). Sin embargo, nuestros datos no reproducen estos resultados en niños de población mexicana.

Tabla 9. Valores de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL) de las muestras agrupadas por genotipo para el rs3792267.

	rs3792267				Valores de referencia
	AA	AG	GG	p	
n	8	59	42		
Glucosa (mg/dL)	84.8 ± 5.7	84.6 ± 1.0	87.4 ± 1.8	0.39	< 100
Colesterol total (mg/dL)	179 ± 12	169 ± 4	172 ± 4	0.63	< 170
Triglicéridos (mg/dL)	76 ± 11	103 ± 8	101 ± 7	0.41	< 100
HDL (mg/dL)	54 ± 4	54 ± 2	51 ± 2	0.64	> 45
LDL (mg/dL)	111 ± 8	109 ± 4	115 ± 3	0.46	< 130

La información se expresa en promedios ± SD mediante un análisis estadístico de ANOVA.

La comparación entre la expresión génica de *CAPN10* entre los niños con valores normales y aquellos fuera de rango de los parámetros bioquímicos colesterol total (1.64 ± 0.42 mg/dL, 1.19 ± 0.49 mg/dL; $p=0.50$) y triglicéridos (1.67 ± 0.41 mg/dL, 1.61 ± 0.82 mg/dL; $p = 0.95$), no muestran diferencia significativa.

11.5. VEGFA

El SNP rs25648 se localiza en la región 5'-UTR del gen *VEGFA*. El análisis *in silico* mostró que este polimorfismo se encuentra en una región del DNA que posiblemente esté involucrada en la regulación de este gen

La genotipificación del rs25648 en un total de 115 niños mostró que las frecuencias de los genotipos fueron de 63% para el homocigoto CC (48), 32% para el heterocigoto CT (24) y 5% para el homocigoto TT (4) (Figura 18).

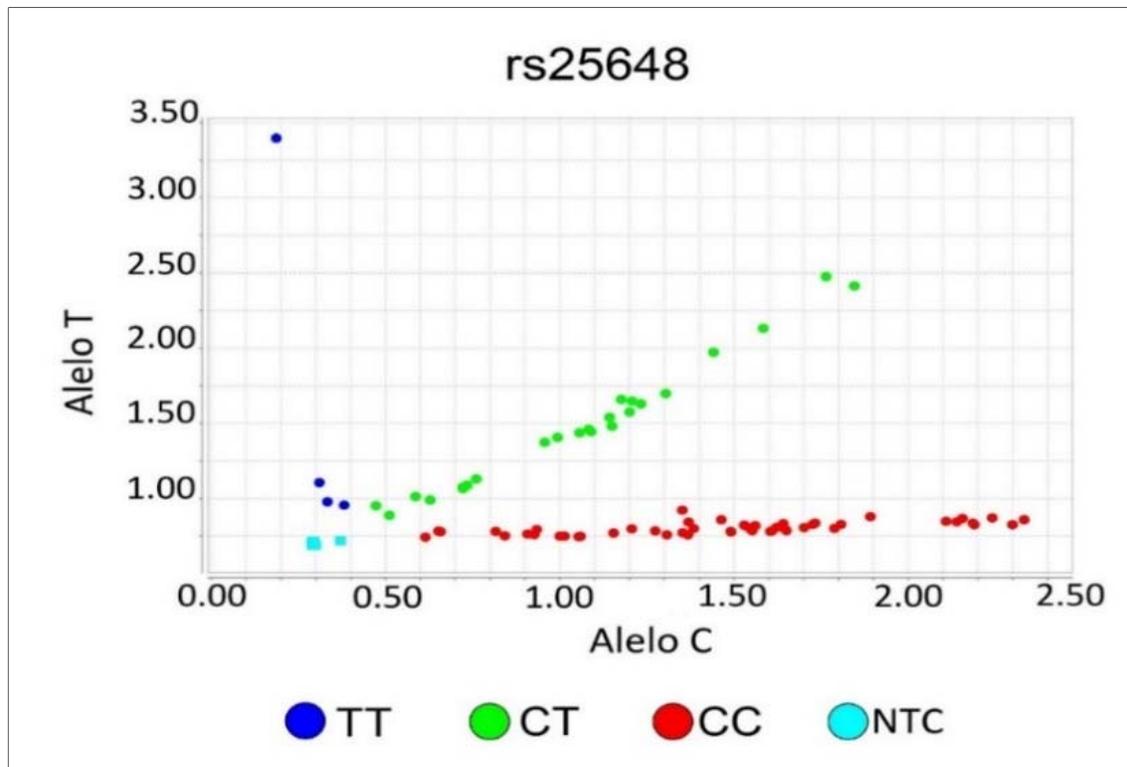


Figura 18. Genotipificación del rs25648 localizado en la región 5'UTR del gen VEGFA.

El número de individuos homocigotos para el alelo variante T del SNP rs25648 fue muy pequeño (4 niños), por lo que se decidió comparar la expresión entre muestras con el genotipo heterocigoto (CT) y homocigotos para el ancestro (CC). El análisis por genotipo del nivel de expresión del gen *VEGFA* no mostró diferencia significativa ($p = 0.55$) entre los grupos del genotipo CC y el genotipo CT (0.95 ± 0.92) (Figura 19).

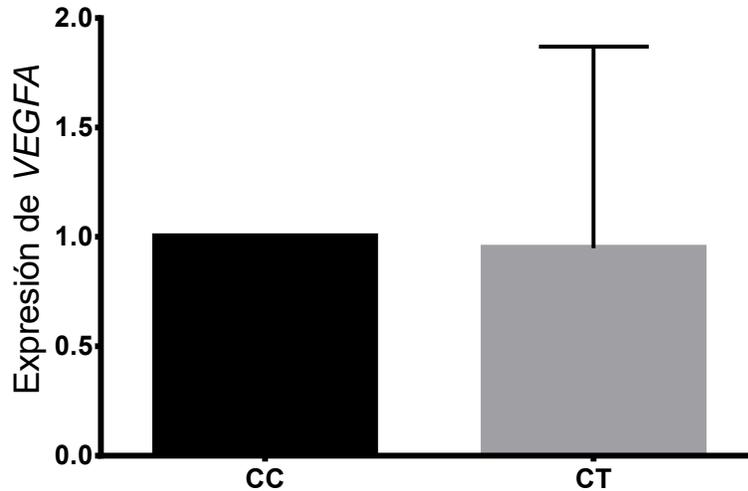


Figura 19. Expresión de VEGFA en niños que presentan el genotipo CC ($n = 6$) en comparación con aquellos con el genotipo CT (0.95 ± 0.92 , $n = 8$). $p = 0.55$

El análisis de la expresión relativa del gen *VEGFA* en niños con el diagnóstico de obesidad y niños con peso normal, no presenta diferencia significativa entre estos dos grupos (1.34 ± 1.09 ; $p = 0.87$) (Figura 20).

VEGFA es un gen que se expresa mayormente en el tejido adiposo (24), en donde se ha descrito que en personas con obesidad se presenta un estado de hipoxia en el tejido adiposo, que trae consigo la activación de *VEGFA* para promover la angiogénesis en este tejido, y disminuir el estado de hipoxia (23,97). Se esperaba encontrar que los niveles de transcrito de *VEGFA* se encontraran elevados en sangre periférica de niños que presentan obesidad, sin embargo, esto no ocurrió.

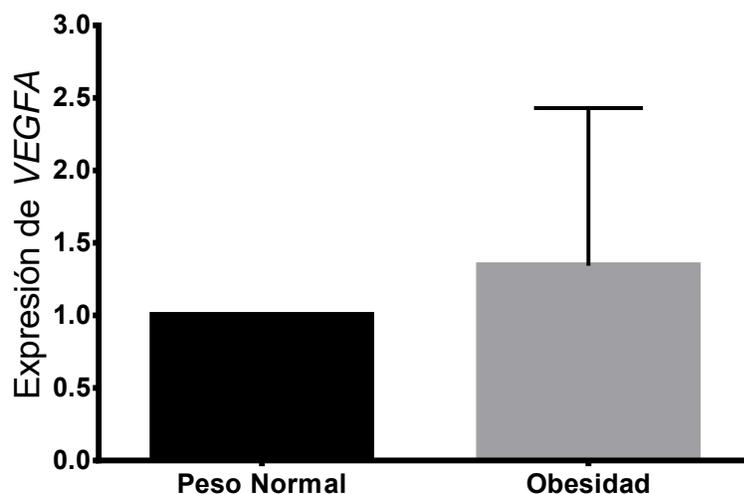


Figura 20. Expresión del gen VEGFA en niños que presentan peso normal ($n = 6$) en comparación con los niños con diagnóstico de obesidad (1.34 ± 1.09 , $n = 8$). $p = 0.87$.

Al agrupar las muestras por genotipos y analizar los valores de los parámetros bioquímicos de glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL, no se encontró diferencia significativa (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL) de las muestras agrupadas por genotipo para el rs25648.

	rs25648				Valores de referencia
	TT	CT	CC	p	
n	4	24	47		
Glucosa (mg/dL)	84.8 ± 4.2	86.1 ± 1.4	86.7 ± 1.3	0.76	< 100
Colesterol total (mg/dL)	164 ± 22	180 ± 7	172 ± 4	0.31	< 170
Triglicéridos (mg/dL)	164 ± 81	108 ± 16	99 ± 7	0.52	< 100
HDL (mg/dL)	52 ± 8	55 ± 3	56 ± 2	0.75	> 45
LDL (mg/dL)	107 ± 13	119 ± 6	110 ± 4	0.18	< 130

La información se expresa en promedios ± SD mediante un análisis estadístico de ANOVA.

Al realizar la comparación entre la expresión génica de VEGFA y los parámetros bioquímicos colesterol total (1.43 ± 0.48 mg/dL, 1.80 ± 0.47 mg/dL; $p = 0.60$) y

triglicéridos (1.39 ± 0.36 mg/dL, 1.34 ± 0.48 mg/dL; $p = 0.94$), no se encontró diferencia significativa.

12. CONCLUSIONES

- La presencia del alelo de riesgo T del rs3758391 aumenta la expresión del gen *SIRT1*.
- Se observó una disminución de la expresión de *CAPN10* en niños que presentan obesidad, lo cual podría alterar los mecanismos de liberación de insulina y la captación de glucosa en el músculo en individuos con obesidad, y contribuir al desarrollo de la DT2 en una edad adulta.
- No se observó cambios en la expresión de los genes *CAPN10* y *VEGFA* en sangre periférica en niños mexicanos que se relacionen con los polimorfismos rs3792267 y rs25648.
- No se encontró asociación entre la expresión de *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA* con los niveles de colesterol total y triglicéridos en la población estudiada.

13.PERSPECTIVAS

- Entre las investigaciones futuras, se considera llevar a cabo el estudio con un mayor número de muestras, que refuerce los resultados obtenidos en este trabajo.
- Con base a los resultados obtenidos del gen SIRT1, iniciar el estudio de este gen en cultivos celulares para encontrar si la proteína sintetizada se presenta de manera proporcional a los niveles de transcrito encontrados.

14. GLOSARIO

cDNA. DNA complementario. Es un DNA de doble cadena que se sintetiza a partir de una hebra simple de mRNA maduro.

Codón. Triplete de nucleótidos que codifica un aminoácido que constituye a una proteína.

Deacetilasa. Molécula implicada en la eliminación de los grupos acetilo.

DNA. Ácido desoxirribonucleico. Ácido nucleico que se encuentra en el núcleo de las células y es el principal constituyente del material genético de los seres vivos.

DNasa. Endonucleasa que genera rupturas no específicas en el DNA de simple o doble cadena, liberando oligonucleótidos.

Exón. Región del DNA que codifica a las proteínas.

Expresión génica. Proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y células eucariotas transforman la información codificada por los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

Fenotipo. Rasgos observables de un individuo, tales como la altura, el color de ojos, y el grupo sanguíneo.

Gen. Segmento de DNA que en su mayoría contienen la información para producir las proteínas.

Genoma. Conjunto de genes y disposición de los mismos en la célula.

Genotipificación. Técnica de laboratorio que se utiliza para determinar la información genética de un organismo, o genotipo, y poder diferenciarlo del resto.

Genotipo. Colección de genes de un individuo.

Intrón. Región de DNA que está presente en un gen pero que no codifica ningún fragmento de las proteínas.

NAD (Dinucleótido de nicotinamida y adenina). Coenzima encargada del intercambio de electrones e hidrogeniones en la producción de energía de todas las células.

Polidipsia. Necesidad exagerada y urgente de beber, que suele ser patológica y acompaña a enfermedades como la diabetes.

Polifagia. Sensación imperiosa e incontenible de hambre que se presenta en determinadas enfermedades.

Poliuria. Excreción muy abundante de orina.

Proteasa. Enzima que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo.

Ribosoma. Organelo de la célula compuestos de agua, proteínas y RNA, y cuya función es participar en la síntesis o fabricación de proteínas.

RNA. Ácido ribonucleico. Ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética.

SNP. Polimorfismo de un solo nucleótido. Cambio puntual de una base nitrogenada en el DNA.

SYBR Green. Compuesto orgánico que es utilizado en la tinción del DNA para el análisis por electroforesis de productos de PCR, o como fluorocromo utilizado como medio de visualización directa de los productos de la PCR en tiempo real.

Telómero. Extremo de los brazos de un cromosoma, que evita que se adhiera a otros cromosomas.

ANEXO 2. CALCULO DE $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para medir la expresión génica, se utilizó el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (116), el cual utiliza los siguientes componentes para su cálculo.

- Muestra problema
- Calibrador
- Gen de interés
- Gen de referencia

La muestra problema se refiere a un fenómeno de interés, es decir, un sujeto con obesidad, niveles altos de glucosa o con el genotipo cualquiera de algún SNP en particular. El calibrador es una muestra que no presenta el fenómeno de interés, considerando los ejemplos anteriores los calibradores adecuados serían los siguientes: un sujeto con peso saludable, niveles normales de glucosa o con el genotipo y del SNP estudiado.

El método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$, compara dos fenómenos, en busca de diferencias en la expresión de uno o varios genes de interés en un tejido en particular. Este método utiliza los valores de C_t dados por una PCR. El C_t es el ciclo en el cual la amplificación de una secuencia de DNA rebasa el ruido (umbral) de la fase exponencial de la reacción de PCR. En la Figura 23 se presenta de manera gráfica. La línea verde indica el umbral y los círculos rojos indican los ciclos en los cuales las amplificaciones de una secuencia de ADN (líneas de colores) cruzan dicho umbral.

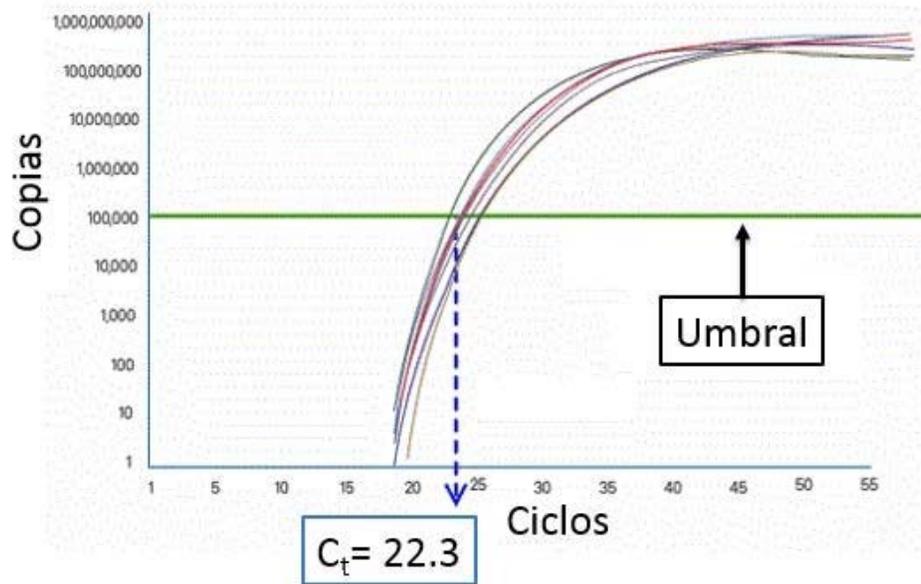


Figura 23. Representación del umbral y Ct en una amplificación por PCR (116).

La fórmula del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ha sido derivada de la siguiente manera:

La ecuación que describe la amplificación exponencial de una PCR es la siguiente.

$$X_n = X_0(1 + E_x)^n \dots\dots\dots(1)$$

Donde X_n es el número de moléculas del gen en un ciclo en específico, X_0 es el número de moléculas inicial de la secuencia de interés, E_x es la eficiencia de la reacción de la secuencia de interés y n es el número de ciclos. La eficiencia de la reacción es la reproducibilidad de la amplificación de una secuencia. En la Figura 25 se puede ver de manera gráfica.

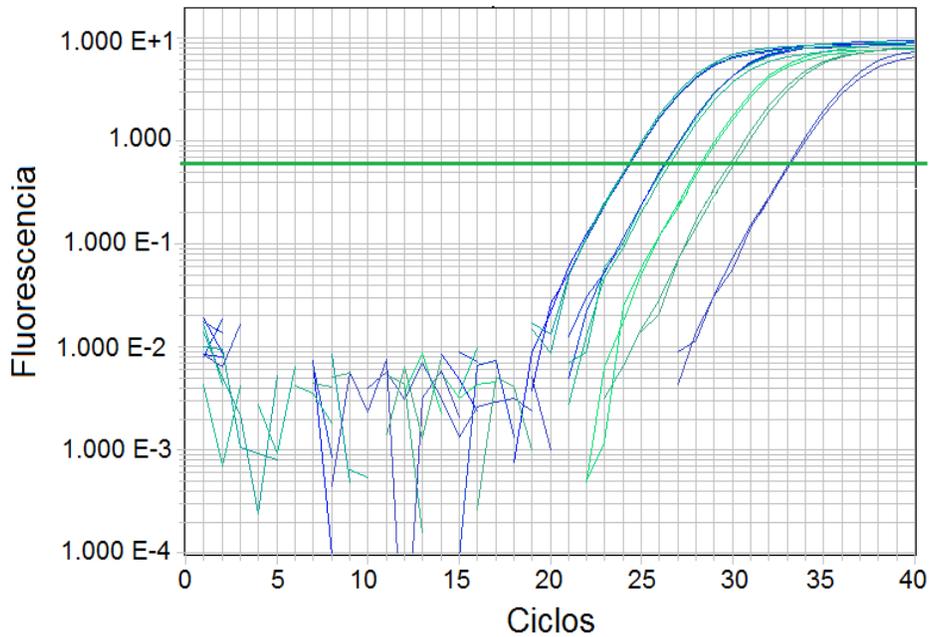


Figura 24. Eficiencia de una reacción de PCR (116).

Como se mencionó este método usa el Ct para calcular el número de moléculas, considerando esto se tiene lo siguiente:

$$X_T = X_0(1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x \dots \dots \dots (2)$$

Donde X_T es el número de moléculas en el Ct de un gen de interés, $C_{T,X}$ es el Ct de la amplificación del gen de interés y K_x es una constante, una ecuación similar se tiene para el gen de referencia.

$$R_T = X_0(1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \dots \dots \dots (3)$$

Donde R_T es el número de moléculas del gen de referencia, E_R la eficiencia de la amplificación del gen de referencia, $C_{T,R}$ es el Ct de la amplificación del gen de referencia y K_R es una constante.

Para la normalización de la expresión de un gen de interés en un tejido específico se necesita un gen de referencia cuya expresión sea constante en dicho tejido, por lo que la fórmula (2) se divide entre la (3)

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0(1+E_X)^{C_{T,X}}}{X_0(1+E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K \dots \dots \dots (4)$$

Asumiendo que la eficiencia de ambas reacciones es igual ($E_X = E_R = E$) y sustituyendo por E se tiene lo siguiente.

$$\frac{X_0}{R_0} X (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \dots \dots \dots (5)$$

Donde al sustituir $\frac{X_0}{R_0}$ por X_N y $C_{T,X} - C_{T,R}$ por ΔC_T se tiene lo siguiente

$$X_N (1 + E)^{\Delta C_T} = K \dots \dots \dots (6)$$

Se despeja X_N la cual es la cantidad normalizada de moléculas del gen en específico en una muestra de interés

$$X_N = K (1 + E)^{-\Delta C_T} \dots \dots \dots (7)$$

Por último se divide X_N de la muestra problema entre la X_N de un calibrador

$$\frac{X_{N,q}}{R_{N,cb}} = \frac{K(1+E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K(1+E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} = K \dots \dots \dots (8)$$

La eficiencia de un producto menor a 15 pb; donde la concentración de los cebadores y magnesio han sido optimizadas es cercana a uno, por lo que al sustituir queda la siguiente ecuación

$$\text{Cantidad de la muestra} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \dots \dots \dots (9)$$

16. REFERENCIAS

1. Aragonés Á, Blasco L, Bueno MG, Cabrinety N. Guías Diagnóstico-Terapéuticas en Endocrinología Pediátrica [Internet]. [citado el 19 de noviembre del 2014]. Disponible en: <http://www.seep.es/privado/consenso.htm>
2. National Heart Lung and Blood Institute, National Institutes of Health (NIH) National Heart, Lung, and Blood Institute N. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. The Evidence Report, NIH. *Arch Intern Med.* 1998;158:51S – 209S.
3. Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissén M, et al. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes.* 1996;45:1585–93.
4. Beck-Nielsen H, Groop LC. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1994 Nov;94(5):1714–21.
5. Groop L, Orho-Melander M. The dysmetabolic syndrome. *J Intern Med.* 2001 Aug;250(2):105–20.
6. Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13:371–6.
7. The NS, Richardson AS, Gordon-Larsen P. Timing and duration of obesity in relation to diabetes: findings from an ethnically diverse, nationally representative sample. *Diabetes Care.* 2013 Apr;36(4):865–72.
8. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet.* 2007;39(7):906–13.
9. Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of Risk of Disease. *The New England journal of medicine.* [Internet] [citado el 18 de octubre del 2014]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=21083407
10. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003;17:419–37.
11. Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:7507–12.
12. Knight JC. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *Journal of Molecular Medicine.* 2005. p. 97–109.
13. Butler JEF, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 2002;16(20):2583–92.
14. Keller B, Martini S, Sedor J, Kretzler M. Linking variants from genome-wide association analysis to function via transcriptional network analysis. *Semin Nephrol.* 2010 Mar;30(2):177–84.

15. Das SK, Sharma NK. Expression quantitative trait analyses to identify causal genetic variants for type 2 diabetes susceptibility. *World J Diabetes*. 2014;5(2):97–114.
16. Nakagawa T, Guarente L. Sirtuins at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124:833–8.
17. Fernández EB. *Fundamentos Moleculares De La Medicina II*. Real Academia Nacional de Medicina, editor. Madrid: Real Academia Nacional de Medicina; 2007. 87-88 p.
18. Carlsson E, Fredriksson J, Groop L, Ridderstråle M. Variation in the calpain-10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:3601–5.
19. Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H. Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese. *Clin Chim Acta*. 2003;336:89–96.
20. Hitman GA, Sudagani J. Searching for genes in diabetes and the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract Suppl*. 2004;3–8.
21. Song Y, You NC, Hsu YH, Sul J, Wang L, Tinker L, et al. Common genetic variation in calpain-10 gene (CAPN10) and diabetes risk in a multi-ethnic cohort of American postmenopausal women. *Hum Mol Genet*. 2007;16:2960–71.
22. Sallinen H, Anttila M, Narvainen J, Koponen J, Hamalainen K, Kholova I, et al. Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice. *Mol Ther*. 2009;17:278–84.
23. Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:107–15.
24. Sun K, Asterholm IW, Kusminski CM, Bueno AC, Wang Z V., Pollard JW, et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. p. 5874–9.
25. Lu F, Qian Y, Li H, Dong M, Lin Y, Du J, et al. Genetic variants on chromosome 6p21.1 and 6p22.3 are associated with type 2 diabetes risk: a case-control study in Han Chinese. *J Hum Genet*. 2012 May;57(5):320–5.
26. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S84–7.
27. Blum A, Socea D, Ben-Shushan RS, Keinan-Boker L, Naftali M, Segol G, et al. A decrease in VEGF and inflammatory markers is associated with diabetic proliferative retinopathy. *Eur Cytokine Netw*. 2012;23(4):158–62.
28. Lu Y. Two Polymorphisms (Rs699947, Rs2010963) in the VEGFA Gene and Diabetic Retinopathy: An Updated Meta-Analysis. *Journal of Diabetes & Metabolism*. 2012.
29. Yang X, Deng Y, Gu H, Lim A, Altankhuyag A, Jia W, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Vis*. 2011;17:3088–96.

30. Spalvier M, Rotenberg R. Aplicaciones del polimorfismo de un solo nucleotido y micromatrices del ADN. *Med (B Aires)*. 2004;64:533–42.
31. Lewin B, Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *Lewin's Genes XI*. 11th ed. Jones & Bartlett Learning; 2014. 940 p.
32. Krebs J, Goldstein E, Kilpatrick S. *Genes fundamentos*. 2nd ed. México DF: Médica Panamericana; 2012. 831 p.
33. Genetics Home Reference. What is DNA? [Internet]. [citado el 22 de febrero del 2015]. Disponible en: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>
34. Solari AJ. *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. 3rd ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004. 556 p.
35. Ward LD, Kellis M. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group; 2012 Nov;30(11):1095–106.
36. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol*. 2010 Jan;220(2):126–39.
37. NCBI. Genetics Review [Internet]. [citado el 15 de octubre del 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Genetics/gene.html>
38. van Driel R, Fransz PF, Verschure PJ. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 20):4067–75.
39. Noonan JP, McCallion AS. Genomics of long-range regulatory elements. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. [citado el 23 de noviembre del 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20438361>
40. Ogbourne S, Antalis TM. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*. 1998;331 (Pt 1):1–14.
41. OMS. *Obesidad y Sobrepeso* [Internet]. [citado el 6 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
42. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M H-ÁM. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX); 2012.
43. CDC. Centers of Disease Control and Prevention. *Clinical Growth Charts* [Internet]. [citado el 26 de noviembre del 2014]. Disponible en: http://www.cdc.gov/growthcharts/clinical_charts.htm
44. SALA XF. *Comprender la obesidad: Causas y complicaciones*. Barcelona: Editorial Amat; 2013. 160 p.
45. American Diabetes Association. *Standards of medical care in diabetes--2014*. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37 Suppl 1(October 2013):S14–80.
46. Carrera Boada C a, Martínez-Moreno JM. Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo “insulin resistance-secretion deficit”. *Nutr Hosp*. 2013 Mar;28 Suppl 2:78–87.

47. Durruty P, García M. Glucotoxicidad y lipotoxicidad: factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo 2. Chile, Rev méd. 2001;671–9.
48. Brunetti A, Chiefari E, Foti D. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes. 2014 Apr 15;5(2):128–40.
49. Tébar Massó FJ, Escobar Jiménez F. La Diabetes en la Práctica Clínica. México DF: Médica Panamericana; 2009. 521 p.
50. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. Clin Chim Acta. 2004;346:161–70.
51. Lopes-Virella MF, Virella G. Lipoproteins and immune responses in the vascular wall and their contribution to atherosclerosis in diabetes. Metabolism. 1992;41:11–5.
52. Endocrinología SM de N y. Complicaciones macrovasculares en la diabetes mellitus tipo 2. Rev Endocrinol y Nutr. 2004;12(1):23–30.
53. Newman DJ, Mattock MB, Dawnay AB, Kerry S, McGuire A, Yaqoob M, et al. Systematic review on urine albumin testing for early detection of diabetic complications. Health technology assessment (Winchester, England). 2005.
54. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. Diabetes Care. 2005;28:956–62.
55. de la Jara C V, Sanz MS, Suárez ET. Retinopatía diabética: Control global del riesgo cardiometabólico. Ediciones Díaz de Santos S.A.; 2012. 14 p.
56. De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Circulation. 2004;110(16):2494–7.
57. Williams MH. Nutrición para la salud la condición física y el deporte (Bicolor). Maryland: Paidotribo; 2002. 504 p.
58. Institute TH. Cholesterol [Internet]. [citado el 15 de marzo del 2015]. Disponible en: http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/HSmart/cholspan.cfm
59. Romualdo MC dos S, de Nóbrega FJ, Escrivão MAMS. Insulin resistance in obese children and adolescents. Jornal de Pediatria. 2014;
60. Pagana KD. Guía de Pruebas Diagnósticas Y de Laboratorio. 8va ed. Barcelona, España: Elsevier Science Health Science Division; 2009. 1112 p.
61. Colpo A. LDL Cholesterol: “Bad” Cholesterol or Bad Science? J Am Physicians Surg. 2005;10(3):83–9.
62. Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. Cell Commun Signal. 2011;9:11.
63. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ. 2006;30:145–51.
64. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P.

Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 2005;434:113–8.

65. Wang RH, Kim HS, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng CX. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2011;121:4477–90.

66. Qiang L, Lin H V., Kim-Muller JY, Welch CL, Gu W, Accili D. Proatherogenic abnormalities of lipid metabolism in SirT1 transgenic mice are mediated through Creb deacetylation. *Cell Metab*. 2011;14:758–67.

67. Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G. Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes*. 2000;49:1165–8.

68. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature*. 2004;429:771–6.

69. Bailey P, Downes M, Lau P, Harris J, Chen SL, Hamamori Y, et al. The nuclear receptor corepressor N-CoR regulates differentiation: N-CoR directly interacts with MyoD. *Mol Endocrinol*. 1999;13:1155–68.

70. Wang R-H, Li C, Deng C-X. Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition. *Int J Biol Sci*. 2010;6:682–90.

71. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab*. 2009;9:327–38.

72. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:9793–8.

73. Ponugoti B, Kim D-H, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem*. 2010;285:33959–70.

74. Cantó C, Auwerx J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacol Rev*. 2012;64:166–87.

75. Kalaany NY, Mangelsdorf DJ. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:159–91.

76. Orallo F, Alvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol*. 2002;61:294–302.

77. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107:137–48.

78. Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B, et al. Association of Sirtuin 1 (SIRT1) Gene SNPs and Transcript Expression Levels With Severe Obesity. *Obesity*. 2012. p. 178–85.

79. Cruz M, Valladares-Salgado A, Garcia-Mena J, Ross K, Edwards M, Angeles-

Martinez J, et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26:261–70.

80. Thomas P, Starlinger J, Vowinkel A, Arzt S, Leser U. GeneView: A comprehensive semantic search engine for PubMed. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(W1).

81. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S12–8.

82. Nishimura T, Goll DE. Binding of calpain fragments to calpastatin. *J Biol Chem*. 1991;266:11842–50.

83. Zatz M, Starling A. Calpains and disease. *N Engl J Med*. 2005;352:2413–23.

84. Esparza-Jiménez M. Calpaínas. *Rev Médica MD*. 2009;1:1–7.

85. Marshall C, Hitman GA, Partridge CJ, Clark A, Ma H, Shearer TR, et al. Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol*. 2005;19:213–24.

86. Sreenan SK, Zhou YP, Otani K, Hansen PA, Currie KP, Pan CY, et al. Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes*. 2001;50:2013–20.

87. Sato Y, Kuwajima M, Kamiya H, Harashima H. Calpain 10 as a predictive gene for type 2 diabetes: evidence from a novel screening system using white blood cells of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biol Pharm Bull*. 2003;26:1765–8.

88. Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstråle M, Lindgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*. 2002;51:2658–64.

89. Pihlajamäki J, Salmenniemi U, Vanttinen M, Ruotsalainen E, Kuusisto J, Vauhkonen I, et al. Common polymorphisms of calpain-10 are associated with abdominal obesity in subjects at high risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49:1560–6.

90. Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, et al. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod*. 2001;65:879–89.

91. Rosales A, Guzmán A. Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico . Revisión. *Rev Mex Ciencias Pecu*. 2011;3(1):89–111.

92. Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci*. 1998;76:1671–81.

93. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273:13313–6.

94. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved

- in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001;26:25–35.
95. Lu Y, Ge Y, Shi Y, Yin J, Huang Z. Two polymorphisms (rs699947, rs2010963) in the VEGFA gene and diabetic retinopathy: an updated meta-analysis. *BMC Ophthalmol*. BMC Ophthalmology; 2013 Jan;13(1):56.
 96. Yang X, Deng Y, Gu H, Lim A, Altankhuyag A, Jia W, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Vis*. 2011 Jan;17(November):3088–96.
 97. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121:2094–101.
 98. Lee PH, Shatkay H. F-SNP: Computationally predicted functional SNPs for disease association studies. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(November 2007):820–4.
 99. Conde L, Vaquerizas JM, Dopazo H, Arbiza L, Reumers J, Rousseau F, et al. PupaSuite: Finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:621–5.
 100. Ward LD, Kellis M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:1–5.
 101. Araujo PR, Yoon K, Ko D, Smith AD, Qiao M, Suresh U, et al. Before it gets started: Regulating translation at the 5' UTR. *Comparative and Functional Genomics*. 2012.
 102. Obesity W. About Obesity [Internet]. [citado el 9 de agosto del 2015]. Disponible en: <http://www.worldobesity.org/aboutobesity/>
 103. Jiménez-corona A, Aguilar-salinas CA. Diabetes mellitus tipo 2 y frecuencia de acciones para su prevención y control. *Salud Publica Mex*. 2013;55(1):137–43.
 104. Vargas-alarc G, Tovilla-z C, Fragoso M. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex*. 2013;149:220–8.
 105. Mejía-Benítez A, Klünder-Klünder M, Yengo L, Meyre D, Aradillas C, Cruz E, et al. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Med Genet*. 2013 Jan;14:21.
 106. Applied Biosystems. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits For 200 and 1000 Reactions Protocol. 2010;1–29.
 107. Applied Biosystems. TaqMan Universal Master Mix II . 2011;4.
 108. UNAM. Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM [Internet]. [citado el 24 de Abril del 2014]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/>
 109. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
 110. Falkenberg VR, Whistler T, Murray JR, Unger ER, Rajeevan MS. Identification

of Phosphoglycerate Kinase 1 (PGK1) as a reference gene for quantitative gene expression measurements in human blood RNA. *BMC Research Notes*. 2011. p. 324.

111. Thermo Scientific. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X). 2011;1–9.

112. González L, Monroy P, Almonacid C, Orjuela O, Huérfano M. Comparative study of risk factors related to cardiovascular disease in children from Bogotá, Colombia and Toluca, Mexico. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2014;71(2):98–105.

113. Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, et al. Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Does Not Solely Control the Rate of Hepatic Gluconeogenesis in the Intact Mouse Liver. *Cell Metab*. 2007;5:313–20.

114. Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman G a, Walker M, et al. Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet*. 2001 Sep;69(3):544–52.

115. Mendoza-Lorenzo P, Salazar AM, Cortes-Arenas E, Saucedo R, Taja-Chayeb L, Flores-Dorantes MT, et al. The reduction of Calpain-10 expression is associated with risk polymorphisms in obese children. *Gene*. Elsevier B.V.; 2013 Mar 1;516(1):126–31.

116. Technologies L. Real-time PCR handbook. Life technologies; 2012. 70 p.